

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Zentrum der Hygiene
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Vergleichende
Untersuchungen zur
Serumempfindlichkeit von
Borrelia lusitaniae

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs
Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Roswitha Dieterich
aus Konstanz

Frankfurt am Main 2010

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. phil. nat. Peter Kraiczky
Korreferent: Prof. Dr. med. Roland Kaufmann
Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2010

1. Einleitung	1
1.1 Borrelien	1
1.1.1 Entdeckung	1
1.1.2 Systematik	1
1.1.3 Lyme- und Rückfallfieber-Borrelien	2
1.1.4 Erregereigenschaften und Morphologie	3
1.1.5 Das Genom von <i>Borrelia burgdorferi</i>	5
1.2 Lyme-Borreliose	5
1.2.1 Epidemiologie:	5
1.2.2 Symptomatik:	6
1.2.3 Diagnostik	8
1.2.4 Therapie und Prognose	10
1.2.5 Prophylaxe	12
1.3 <i>Borrelia lusitaniae</i>	12
1.3.1 Ökologie	13
1.3.2 Pathogenität von <i>B. lusitaniae</i>	14
1.4 Das Komplementsystem	16
1.4.1 Aufbau und Nomenklatur	16
1.4.2 Funktion des Komplementsystems	16
1.4.3 Aktivierung des Komplementsystems	17
1.4.4 Regulation des Komplementsystems	19
1.4.5 Die Faktor H-Proteinfamilie	20
1.5 Komplementresistenz als Virulenzfaktor bei Mikroorganismen	21
1.5.1 Serumresistenz durch Bindung von Komplementregulatoren	21
1.5.2 Complement Regulator Acquiring Surface Proteins (CRASPs) von <i>B. burgdorferi</i>	22
1.5.3 Erp-Proteine von <i>B. burgdorferi</i>	24
1.6 Ziele dieser Arbeit:	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Bakterien	27
2.1.1.1 Borrelien-Stämme	27
2.1.1.2 <i>E. coli</i> -Stämme	27
2.1.2 Antikörper	28

2.1.2.1 Primär-Antikörper	28
2.1.2.2 Konjugierte Sekundär-Antikörper	28
2.1.3 Enzyme	28
2.1.4 Kits	29
2.1.5 Proteine	29
2.1.6 DNA- und Proteinstandards	29
2.1.7 Nukleotide für die PCR	30
2.1.8 Oligonukleotide	30
2.1.9 Basisvektoren	30
2.1.10 Chemikalien	31
2.1.11 Geräte	33
2.1.12 Spezielle Materialien	35
2.1.12.1 Normales Humanserum (NHS)	35
2.1.12.2 Hitzeinaktiviertes NHS (hiNHS)	35
2.1.13 Andere Materialien	35
2.1.14 Kulturmedien	36
2.1.14.1 Modifiziertes Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK-Medium) zur Kultivierung von Borrelien	36
2.1.14.2 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.1.15 Lösungen und Puffer für PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	37
2.1.15.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.1.15.2 Kolloidale Coomassie-Färbung	38
2.1.15.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	38
2.1.15.4 Westernblot	38
2.1.15.5 Ligandenaffinitätsblot-Analyse	39
2.1.15.6 Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	39
2.1.15.7 ELISA und Kofaktor-Assay	39
2.1.16 Lösungen und Puffer für MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	40
2.1.16.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
2.1.16.2 Agarosegele	40
2.1.16.3 Southern Blot-Analyse	40
2.1.17 Lösungen und Puffer für SPEZIELLE METHODEN	41
2.1.17.1 Allgemein verwendete Puffer	41
2.1.17.2 Borrelienzelllysate	41

2.1.17.3 Plasmidisolierung aus Borrelien.....	41
2.1.17.4 Opsonisierungstest	41
2.1.17.5 Serumadsorptionstest	42
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	43
2.2.1.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.1.2 Westernblot	43
2.2.1.3 Westernblot-Analyse	43
2.2.1.4 Ligandenaffinitätsblot-Analyse	44
2.2.1.5 Kolloidale Coomassie-Färbung.....	45
2.2.1.6 Silberfärbung von SDS-Gelen.....	46
2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
2.2.1.8 Überexpression von Proteinen im kleinen Versuchsmaßstab	46
2.2.1.9 Überexpression von Proteinen im großen Versuchsmaßstab	46
2.2.1.10 Chromatographische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	47
2.2.1.11 Protease-Assay	47
2.2.1.12 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	48
2.2.1.13 Kofaktor-Assay mit gereinigtem GST-Fusionsprotein	49
2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	49
2.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	49
2.2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	51
2.2.2.3 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	52
2.2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	52
2.2.2.5 Restriktionsanalyse.....	52
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	53
2.2.2.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	53
2.2.2.8 Southern Blot-Analyse	53
2.2.2.9 DNA-Sequenzierung	54
2.2.3 SPEZIELLE METHODEN	55
2.2.3.1 In vitro-Kultivierung von Borrelien	55
2.2.3.2 In vitro-Kultivierung von <i>E. coli</i>	55
2.2.3.3 Herstellung von Übernachtskulturen	55
2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Borrelien im Dunkelfeldmikroskop	56
2.2.3.5 Bestimmung der Zelldichte einer <i>E. coli</i> -Kultur	56

2.2.3.6 Herstellung eines Zelllysates von Borrelien mit Ultraschall.....	56
2.2.3.7 Herstellung eines Zelllysates von <i>E. coli</i> mit Ultraschall	56
2.2.3.8 Plasmidisolierung aus Borrelien.....	56
2.2.3.9 Colorimetrischer Bakterizidie Assay (CBA).....	57
2.2.3.10 Immunfluoreszenztest (IFT).....	58
2.2.3.11 Serumadsorptionstest	58
2.2.3.12 Kofaktor-Assay	59
2.2.3.13 Opsonisierungstest	59
3. Ergebnisse	61
3.1 Untersuchungen zur Serumempfindlichkeit von <i>B. lusitaniae</i>	61
3.1.1 Analyse des Proteinexpressionsmusters von verschiedenen <i>B. lusitaniae</i> - Stämmen.....	61
3.1.2 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>B. lusitaniae</i> in normalem Humanserum	63
3.1.3 Untersuchung aktivierter Komplementkomponenten auf der Oberfläche von <i>B. lusitaniae</i>	65
3.1.4 Grundlegende Studien zur Komplementaktivierung von <i>B. lusitaniae</i>	68
3.2 Analyse der Faktor H-Bindung bei <i>B. lusitaniae</i>	70
3.2.1 Identifikation Faktor H-bindender Proteine bei <i>B. lusitaniae</i> mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse	70
3.2.2 Analyse der an <i>B. lusitaniae</i> gebundenen Proteine der Faktor H-Familie	71
3.2.3 Untersuchung der Kofaktoraktivität von an Borrelien gebundenem Faktor H...	73
3.3 Charakterisierung eines Faktor H-bindenden Proteins von <i>B. lusitaniae</i>	75
3.3.1 Amplifikation des für das Faktor H-bindende Protein kodierende Gen von <i>B. lusitaniae</i> MT-M8.....	75
3.3.2 Klonierung <i>erp</i> -orthologer Gene von <i>B. lusitaniae</i> MT-M8 und Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	76
3.3.3 Analyse des <i>erp</i> -orthologen Gens von <i>B. lusitaniae</i> MT-M8	77
3.3.4 Herstellung eines GST-Fusionsproteins von BICRASP-3	80
3.4 Charakterisierung des Bindungsverhaltens von BICRASP-3	81
3.4.1 Analyse der Interaktion von BICRASP-3 mit Proteinen der Faktor H-Familie..	81
3.4.2 Untersuchung der Kofaktoraktivität von an gereinigtem BICRASP-3 gebundenem Faktor H	83

3.4.3 Lokalisierung der mit BICRASP-3 interagierenden SCR-Domäne von Faktor H.....	84
3.4.4 Lokalisation von BICRASP-3 auf der Zelloberfläche von <i>B. lusitaniae</i>	85
3.5 Identifizierung <i>erp</i> -orthologer Gensequenzen bei verschiedenen <i>B. lusitaniae</i> -Isolaten	86
3.5.1 Amplifikation und Identifikation BICRASP-3-orthologer Gensequenzen von <i>B. lusitaniae</i>	86
3.5.2 Analyse <i>erp</i> -orthologer Gensequenzen bei <i>B. lusitaniae</i> -Isolaten	87
3.6 Identifizierung BICRASP-3-orthologer Gensequenzen innerhalb der Genospezies <i>B. lusitaniae</i>	89
3.6.1 Genotypische Analyse des Plasmidprofils von <i>B. lusitaniae</i> -Isolaten	89
3.6.2 Lokalisierung <i>erp</i> -homologer Gensequenzen auf den Plasmiden von <i>B. lusitaniae</i> mittels Southern Blot-Analyse	91
4. Diskussion	94
4.1 Vergleichende Analyse des Proteinmusters von <i>B. lusitaniae</i>	94
4.2 Vergleichende Untersuchungen zur Serumempfindlichkeit von <i>B. lusitaniae</i>	95
4.2.1 Untersuchung der Serumempfindlichkeit von <i>B. lusitaniae</i> mittels Serumbakterizidietest und Nachweis aktivierter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche	95
4.2.2 Grundlegende Studien zur Komplementaktivierung von <i>B. lusitaniae</i>	97
4.3 Analyse der Interaktion von <i>B. lusitaniae</i> mit Faktor H	98
4.3.1 Identifikation Faktor H-bindender Proteine bei <i>B. lusitaniae</i>	98
4.3.2 Analyse der an <i>B. lusitaniae</i> gebundenen Proteine der Faktor H-Proteinfamilie	99
4.3.3 Analyse der Kofaktoraktivität von an <i>B. lusitaniae</i> gebundenem Faktor H	100
4.4 Charakterisierung eines Faktor H-bindenden Proteins von <i>B. lusitaniae</i>	101
4.4.1 Analyse des für das Faktor H-bindende Protein von <i>B. lusitaniae</i> MT-M8 kodierenden Gens	101
4.4.2 Charakteristika des Faktor H-bindenden BICRASP-3 Proteins von <i>B. lusitaniae</i> MT-M8.....	101
4.4.3 Analyse des Bindungsverhaltens von Faktor H an BICRASP-3	105
4.4.4 Analyse von Kofaktoraktivität und der Interaktionsdomäne von an BICRASP-3 gebundenem Faktor H	106
4.4.5 Lokalisation von BICRASP-3 auf der Zelloberfläche von <i>B. lusitaniae</i>	107

4.5 Identifizierung <i>erp</i> -orthologer Gensequenzen bei verschiedenen <i>B. lusitaniae</i> - Isolaten	108
4.5.1 Analyse BICRASP-3-orthologer Gensequenzen von <i>B. lusitaniae</i>	108
4.6 Identifizierung BICRASP-3-orthologer Gensequenzen innerhalb der Genospezies <i>B. lusitaniae</i>	109
4.6.1 Analyse der Plasmide von <i>B. lusitaniae</i> -Isolaten und Lokalisierung <i>erp</i> - homologer Gensequenzen	109
5. Zusammenfassung/ Abstract	112
5.1 Zusammenfassung	112
5.2 Abstract	114
6. Literaturverzeichnis	116
7. Abkürzungsverzeichnis	135
8. Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis	138
8.1 Abbildungsverzeichnis	138
8.2 Tabellenverzeichnis	140
9. Internetadressen	141
10. Danksagung	142
Anhang	i

1. Einleitung

1.1 Borrelien

1.1.1 Entdeckung

Bereits im Jahr 1977 wurde das Krankheitsbild der Lyme-Borreliose von Allen C. Steere et al. beschrieben, nachdem in der Kleinstadt Lyme in Connecticut, USA, gehäuft oligoartikuläre Arthritiden, v. a. bei Kindern aufgetreten waren. Schon damals zog man eine Übertragung des auslösenden Erregers durch Arthropoden in Betracht (Steere et al., 1977). Die Isolierung von Spirochäten aus dem Mitteldarm der Zeckenspezies *Ixodes dammini* gelang Willy Burgdorfer et al. erst im Jahre 1981 (Burgdorfer et al., 1982). Die Erstbenennung von *Borrelia burgdorferi* sp. nov. als dem Erreger der Lyme-Borreliose erfolgte dann im Jahr 1984 durch Reid C. Johnson (Johnson et al., 1984).

1.1.2 Systematik

Borrelia ist eine Gattung der Familie Spirochaetaceae. Zu diesen gehören neben den Spezies *Brevinema*, *Cristispira*, *Spirochaeta* und *Spironema* die humanpathogenen Arten *Borrelia* und *Treponema*. Zu der übergeordneten Ordnung der Spirochaetales zählen außerdem die medizinisch relevanten Leptospiren (Paster und Dewhirst, 2001).

Einen Überblick über die Taxonomie der Borrelien gibt Tab. 1.1, eine Beschreibung der Charakteristika der Familie und der Gattung Tab 1.2.

Domäne:	Bakterien
Abteilung:	Spirochaetes
Klasse:	Spirochaetes
Ordnung:	Spirochaetales
Familie:	Spirochaetaceae
Gattung:	<i>Borrelia</i>

Tab. 1.1, Systematik der Gattung *Borrelia* (entnommen aus Paster und Dewhirst, 2001)

Charakteristika der Familie Spirochaetaceae	Charakteristika der Gattung <i>Borrelia</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ helikal gewundene, bewegliche Zellen ▪ eine äußere Zellmembran umgibt den protoplasmatischen Zylinder, bestehend aus Zytoplasma, innerer Zellmembran und Peptidoglykanschicht ▪ im periplasmatischen Raum zwischen äußerer Membran und protoplastischem Zylinder befinden sich mehrere Flagellen, die distal an den beiden Enden des protoplastischen Zylinders ansetzen ▪ Resistenz gegen Rifampicin 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ durch blutsaugenden Arthropoden auf Wirbeltiere übertragen ▪ GC-Gehalt der genomischen DNA beträgt 27 – 32%

Tab. 1.2, Charakteristika der Spirochaetaceae und Borrelien (entnommen aus Barbour und Hayes, 1986)

1.1.3 Lyme- und Rückfallfieber-Borrelien

Die Borrelien werden anhand phylogenetischer Unterschiede und den mit ihnen verbundenen Krankheitsbildern in zwei Gruppen eingeteilt: die Rückfallfieber-Borrelien und die Lyme-Borrelien. Letztere werden auch als *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zusammengefasst.

Es sind mittlerweile bis zu 15 Genospezies bekannt, ihre Gruppenzugehörigkeit ist in Tab. 1.3 aufgelistet.

Lyme-Borrelien	Rückfallfieber-Borrelien
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	<i>B. recurrentis</i>
<i>B. afzelii</i>	<i>B. hermsii</i>
<i>B. garinii</i>	<i>B. parkeri</i>
<i>B. spielmanii</i>	<i>B. turicatae</i>
<i>B. lusitaniae</i>	<i>B. mazzottii</i>
<i>B. japonica</i>	<i>B. venezuelensis</i>
<i>B. valaisiana</i>	<i>B. crocidurae</i>
<i>B. andersonii</i>	<i>B. hispanica</i>
<i>B. tanukii</i>	<i>B. caucasica</i>
<i>B. turdi</i>	<i>B. latyschevii</i>
<i>B. sinica</i>	<i>B. persica</i>
<i>B. bissettii</i>	<i>B. duttonii</i>
<i>B. californiensis</i>	<i>B. lonestari</i>
<i>B. carolinensis</i>	<i>B. miyamotoi</i>
<i>B. bavariensis</i>	<i>B. tillae</i>
	<i>B. graingeri</i>

Tab. 1.3, Klassifizierung der Lyme- und Rückfallfieber-Borrelien (entnommen aus Baranton et al., 1992; Barbour und Hayes, 1986; Barbour et al., 1996; Canica et al., 1993; Fukunaga et al., 1996; Johnson et al., 1984; Kawabata et al., 1993; Le Fleche et al., 1997; Marconi et al., 1995; Margos et al., 2009; Masuzawa et al., 2001; Postic et al., 1998, 2007; Rebaudet und Parola, 2006; Richter und Matuschka, 2006; Rudenko et al., 2008; Wang et al., 1997, 1999a, 1999b)

Innerhalb der Lyme-Borrelien gelten *Borrelia burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* und *B. bavariensis* als humanpathogen. Die Spezies *B. valaisiana*, *B. bissettii* und auch *B. lusitaniae* sind bisher zwar mit einer klinischen Symptomatik in Zusammenhang gebracht worden, jedoch ist ihr Status bezüglich eines krankmachenden Potentials beim Menschen noch nicht eindeutig geklärt. Tab. 1.4 fasst die Daten über Pathogenität, geographisches Vorkommen und Reservoir der Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplexes zusammen.

Genospezies	Pathogenitätsstatus	Verbreitungsgebiet	Reservoir
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	humanpathogen	USA und Europa	kleine Nagetiere
<i>B. afzelii</i>	humanpathogen	Europa und Ostasien	Nagetiere
<i>B. garinii</i>	humanpathogen	Europa und Ostasien	Vögel
<i>B. spielmanii</i>	humanpathogen	Europa	Siebenschläfer, Haselmaus, Fuchs
<i>B. bavariensis</i>	humanpathogen	Europa	Nagetiere
<i>B. lusitaniae</i>	ungeklärt	Europa	Eidechsen, Vögel
<i>B. valaisiana</i>	ungeklärt	Europa und Ostasien	Vögel
<i>B. japonica</i>	apathogen	Japan	Nagetiere
<i>B. tanukii</i>	apathogen	Japan	Wald-, Wühlmäuse
<i>B. turdi</i>	apathogen	Japan	Nagetiere
<i>B. sinica</i>	apathogen	China	Nagetiere
<i>B. andersonii</i>	apathogen	USA	Waldkaninchen
<i>B. bissettii</i>	ungeklärt	USA	Nagetiere, Vögel
<i>B. californiensis</i>	ungeklärt	USA	Nagetiere
<i>B. carolinensis</i>	ungeklärt	USA	Nagetiere

Tab. 1.4, Pathogenität, Verbreitungsgebiet und Reservoir der Lyme-Borrelien (entnommen aus Baranton et al., 1992; Canica et al., 1993; Collares-Pereira et al., 2004; Diza et al., 2004; Földvári et al., 2005; Fukunaga et al., 1996; Herzberger, 2008; Humair et al., 1995; Ishiguro et al., 1995; Johnson et al., 1984; Kawabata et al., 1993; Kee et al., 1996; Kurtenbach et al., 1998; Le Fleche et al., 1997; Marconi et al., 1995; Margos et al., 2009; Masuzawa et al., 1996, 1999, 2000, 2001; Picken et al., 1996; Postic et al., 1998, 2007; Poupon et al., 2006; Richter et al., 2004; Richter und Matuschka, 2006; Rijpkema et al., 1997; Rudenko et al., 2008; Ryffel et al., 1999; Strle et al., 1997; van Dam et al., 1993; Wang et al., 1997, 1999a)

1.1.4 Erregereigenschaften und Morphologie

Borrelien sind gramnegative, spiralförmige Bakterien, die sich kulturell unter mikroaerophilen Bedingungen anzüchten lassen (s. Abb. 1.1). Die Generationszeit in Kultur beträgt 7 bis 20 Stunden bei einem Temperaturoptimum von 33°C. Wie mit ihrem obligatorisch parasitären Lebensstil vereinbar, sind Borrelien sehr anspruchsvolle Bakterien, die nur zu wenigen eigenen Syntheseleistungen in der Lage sind (Das et al., 2001). Die kulturelle Anzucht erfolgt in modifiziertem Barbour-Stoenner-Kelly-Medium, einem komplexen Flüssigmedium, welches neben anderen Nährstoffen auch Rinderserumalbumin und Kaninchenserum enthält.

Borrelien sind, abhängig von der Borrelienart und dem Alter der Kultur, 8-30 μm lang. Ihr Durchmesser beträgt 0,2-0,5 μm (Barbour und Hayes, 1986).

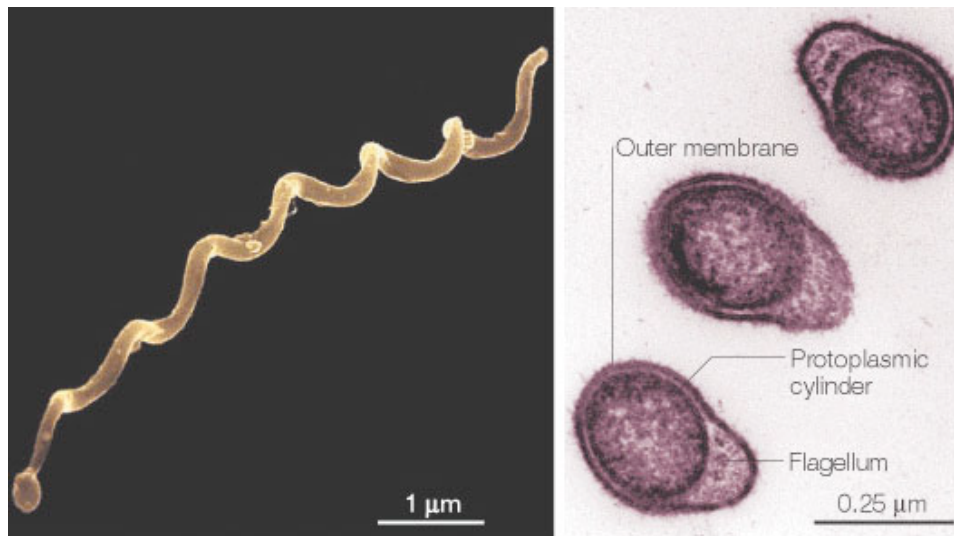


Abb. 1.1, Elektronenmikroskopische Bilder von Borrelien, links: Scanning Elektronenmikroskop, rechts: Transmission Elektronenmikroskop (entnommen aus Rosa et al., 2005)

Eine Borrelienzelle besteht im Querschnitt, von außen nach innen betrachtet, aus den folgenden Strukturen (s. Abb. 1.2):

S-Lager	2-10 nm dicke, amorphe, mukoide Schicht
Zellmembran	trilaminär, sehr flexibel
periplasmatischer Raum	zwischen äußerer und mittlerer Schicht der Zellmembran, enthält die Endoflagellen
protoplasmatischer Zylinder	enthält Nukleoplasma, Ribosomen, DNA-assoziierte Moleküle u. a.

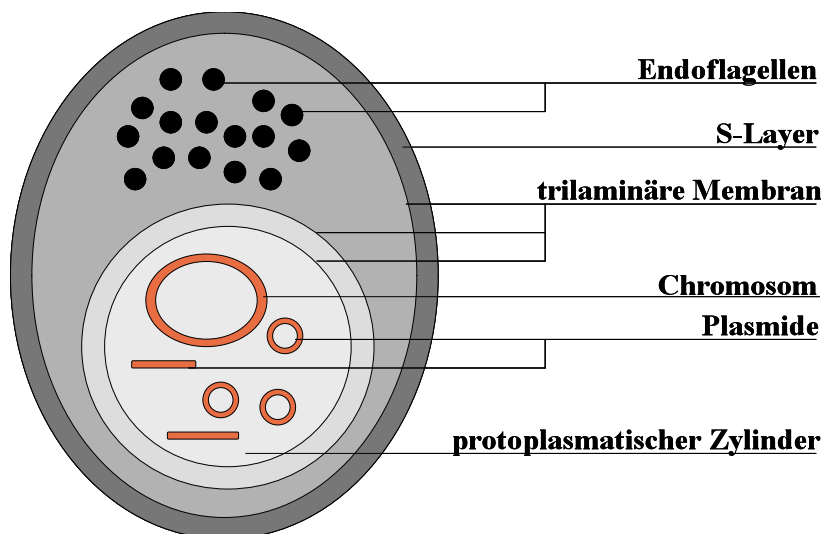


Abb. 1.2, schematischer Querschnitt einer Borrelienzelle (modifiziert nach Kraiczy P. et al., 1998)

Borrelien sind in der Lage Vesikel auszubilden, welche als Blebs bezeichnet werden. Sie stellen Umstülpungen bzw. Abschnürungen der äußeren trilaminären Membran dar, welche unter anderem DNA enthalten (Kudryashev et al., 2009). Borrelien bilden Blebs aus, wenn die Umweltbedingungen ungünstig sind, z.B. bei schlechtem Nährstoffangebot, wenn die Zellen eingefroren und aufgetaut werden oder wenn sie der Einwirkung von Komplement ausgesetzt sind. Dies hat zur Bildung von zwei Theorien bezüglich der Bedeutung der Blebs geführt. Die eine Theorie besagt, dass Blebs eine Dauerform darstellen, vergleichbar mit den Sporen der Bazillen oder Clostridien, aus der sich die Bakterien unter günstigeren Bedingungen wieder entwickeln können. Die andere Theorie betrachtet die Blebs als Zellpartikel, die sich zusammenlagern, wenn sich die Bakterien auflösen und sterben (Barbour und Hayes, 1986).

1.1.5 Das Genom von *Borrelia burgdorferi*

Borrelien besitzen ein lineares Chromosom von ca. 910 000 Basenpaaren und zahlreiche extrachromosomale Elemente bzw. Plasmide. Bei dem *B. burgdorferi*-Stamm B31 wurden bis zu 24 Plasmide nachgewiesen, hierbei handelt es sich um 12 zirkuläre und 12 lineare Plasmide – eine Besonderheit von Borrelien. Das gesamte Genom dieses Stammes besteht aus ca. 1,5 Millionen Basenpaaren. Bei einer kontinuierlichen Kultivierung in vitro kommt es vor, dass Borrelien Plasmide verlieren, womit ein Verlust der Infektiosität der Bakterien in vivo einhergeht (Casjens et al., 1997; Casjens S., 2001; Miller et al., 2000; Rosa et al., 2005).

1.2 Lyme-Borreliose

1.2.1 Epidemiologie

Die Lyme-Borreliose ist eine Anthropozoonose, hervorgerufen durch die pathogenen Spezies des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes, die durch den Stich einer infizierten Zecke aus der Ixodes-Familie auf den Menschen übertragen wird. Die Zecken infizieren sich mit Borrelien in einem komplexen Zyklus zwischen Zecke und Wirt. Das Erregerreservoir stellen, je nach geographischem Vorkommen, verschiedene Vertebraten dar (s. Tab. 1.4).

In Europa beträgt die Durchseuchung der Zecken mit Borrelien 5-35 %, wobei adulte Zecken zu 20 %, Nymphen zu 10 % und Larven nur zu ca. 1 % befallen sind. In Deutschland ist nach einem Zeckenstich bei 1,5 – 6 % der Betroffenen mit einer Infektion zu rechnen, jedoch wird die Erkrankung nur bei 0,3 – 1,4 % klinisch manifest (Robert Koch Institut, 2007). Generell steigt die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung der Spirochäten mit zunehmender Dauer des

Saugaktes der Zecke. In der Literatur wird eine Zeitspanne von in der Regel mindestens 24 Stunden angegeben (Piesman, 1993).

Der Stich der Zecke selbst bleibt in der Regel symptomlos. Lokale Reizerscheinungen im Sinne von Rötung und Juckreiz können auftreten, sind jedoch kein Anzeichen für eine Infektion des Menschen mit Borrelien.

Auf Grund der Ökologie des Wirtes tritt die Lyme-Borreliose in den Sommermonaten gehäuft auf, meist von März bis Oktober, je nach Witterung jedoch auch früher oder später im Jahr. Die Frühformen der Erkrankung treten auf Grund der relativ kurzen Inkubationszeit saisonal gehäuft auf. Das Erythema migrans besitzt in den Monaten Juni und Juli einen Inzidenz Gipfel, während die akute Neuroborreliose im Juli und August gehäuft auftritt (Robert Koch Institut, 2007).

Derzeit ist die Lyme-Borreliose die häufigste durch einen Vektor übertragene Erkrankung in Nordamerika und Europa. Der CDC wurde im Jahr 2006 eine Inzidenz von 8,2 Fällen pro 100 000 Einwohner in den Vereinigten Staaten gemeldet (CDC, 2006). Daten für Europa schwanken von geschätzten 206 Fällen pro 100 000 Einwohner in Slowenien und 135 pro 100 000 in Österreich bis 0,001 Fällen pro 100 000 in Italien im Jahr 2005. Allerdings besteht in Europa kein einheitliches Meldesystem (Smith et al., 2006). Auch in Deutschland ist die Erkrankung an Lyme-Borreliose nur in den sechs östlichen Bundesländern meldepflichtig, allerdings werden über ganz Deutschland 25 Fällen pro 100 000 mit steigender Tendenz geschätzt (Mehnert und Krause, 2005; Robert Koch Institut, 2005). Daher stellt die Lyme-Borreliose durchaus ein ernst zu nehmendes Krankheitsbild dar.

1.2.2 Symptomatik

Die unbehandelte Lyme-Borreliose verläuft typischerweise, wie auch die Infektionen mit anderen Spirochäten, in drei Phasen. Hierbei muss die Erkrankung jedoch keineswegs jedes Stadium durchlaufen. Im Gegenteil kann jedes Stadium als Erstmanifestation klinisch symptomatisch werden und häufig werden Stadien auch übersprungen.

Die im Folgenden beschriebenen Grundzüge der Lyme-Erkrankung sind weltweit gültig. Regionale Unterschiede in der klinischen Ausprägung des Krankheitsbildes werden jedoch vor allem zwischen Erkrankungen in den USA und in Europa bzw. Asien beobachtet. Dies ist zumindest zum Teil auf die unterschiedlichen geographisch vorherrschenden Borrelienspezies zurückzuführen (Steere, 2001).

Stadium I, lokalisierte Infektion:

Nach einer Inkubationszeit von Tagen bis Wochen nach Zeckenstich tritt in ca. 80 % der Fälle ein Erythema chronicum migrans (EM) auf. Dieses beginnt als rote Makula oder Papel am Ort des Zeckenstichs und entwickelt sich zu einer typischerweise ringförmigen Rötung mit zentraler Abblassung (Steere, 2001). Begleitende milde Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Fieber treten in Europa selten, in den USA jedoch häufig auf (Strle et al., 1999).

Stadium II, disseminierte Infektion:

Wochen bis Monate nach der Infektion kann es zur akuten disseminierten Infektion kommen. Hierbei können typische, sekundäre EM-Läsionen auftreten.

Bei ca. 15 % der unbehandelten Patienten in den USA tritt eine akute Neuroborreliose auf. Im Rahmen einer lymphozytären Meningitis bestehen Kopfschmerzen und Nackensteifigkeit, eine milde Enzephalitis geht mit Merkstörungen einher. Eine kraniale Neuropathie, v. a. mit ein- oder beidseitiger Fazialisparese kann auftreten, sowie eine motorische oder sensorische Radikuloneuritis. Diese neurologischen Symptome, auch als Meningoradikulitis Bannwarth bezeichnet, sind in der Regel innerhalb von Wochen bis Monaten selbstlimitierend (Oschmann et al., 1998).

Bei ca. 5 % der Patienten kommt es zu einer Mitbeteiligung des Herzens, häufigstes Symptom sind hierbei fluktuierende Grade von AV-Block. Selten können auch eine akute Myoperikarditis, linksventrikuläre Dysfunktion, Kardiomegalie und Pankarditis auftreten (Lardieri et al., 1993; Stanek et al., 1990; Steere, 1989).

Wandernde, fluktuierende, kurzzeitige (Wochen bis Monate) oligoartikuläre Arthritiden mit Gelenkschwellung und Schmerzen treten im Rahmen der disseminierten Infektion bei 60 % der Patienten in den USA auf, weniger häufig in Europa. Typisch ist eine fluktuierende, Wochen bis Monate anhaltende Entzündung mit schmerzhafter Schwellung verschiedener Gelenke. Hierbei sind meist die großen Gelenke betroffen, meist das Knie, jedoch seltener auch andere große und kleine Gelenke (CDC, 1997; Steere, 1989).

Eine weitere Manifestation, vermutlich durch *B. afzelii* und *B. garinii* ausgelöst, ist das Borrelien-Lymphozytom. Dies tritt bei Patienten in Europa auf und besteht in einem Tumor-ähnlichen Knötchen am Ohrläppchen, im Bereich der Brustwarze, oder am Skrotum, welches sich spontan zurückbildet (Picken et al., 1997).

Auch über eine seltene Beteiligung der Augen im Sinne einer Konjunktivitis, Uveitis, Keratitis, Vitritis oder Optikusneuritis wurde berichtet. Dabei kann eine Optikusneuritis oder eine Erhöhung des Hirndrucks bei Kindern zu Blindheit führen (Rothermel et al., 2001).

Stadium III, chronische Infektion:

Monate bis Jahre nach einer Infektion können vielfältige Organstörungen auftreten. Im Rahmen einer chronischen Neuroborreliose können Müdigkeit, Hörverlust, Enzephalomyelitis und Polyneuropathie auftreten (Logigian et al., 1990; Oschmann et al., 1998).

Typische Hauterscheinungen sind die Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer (ACA) mit fleckigen Hautatrophien vor allem an den Streckseiten der Extremitäten (Asbrink und Hovmark, 1985).

Eine Beteiligung der Gelenke präsentiert sich meist als therapieresistente Mono- oder Oligoarthritis der großen Gelenke, welche über Monate oder sogar einige Jahr anhalten kann. Mitursache dieser chronischen Syndrome sind möglicherweise Autoimmunprozesse und postinfektiöse Phänomene (CDC, 1997; Nadelman und Wormser, 1998; Oschmann et al., 1998; Steere, 2001).

Die hier beschriebene klassische Einteilung der Borreliose in drei Stadien ist für die klinische Betrachtung wenig geeignet. Fragestellungen in Zusammenhang mit Diagnostik, Therapie und Prognose der Erkrankung wird eine Einteilung in ein Frühstadium mit akuten Beschwerden und ein Spätstadium mit den chronischen Formen der Erkrankung mehr gerecht.

Bei Infektion mit manchen Borrelien des Lyme-Komplexes wurde ein Zusammenhang zwischen der Borrelienspezies und der Ausprägung der Symptomatik festgestellt (Organotropismus). *B. burgdorferi* verursacht beim Menschen häufiger Lyme-Arthritiden, Infektion mit *B. afzelii* verursacht häufiger Acrodermatitis chronica atrophicans und Patienten mit einer Infektion mit *B. garinii* zeigen vermehrt das klinische Krankheitsbild einer Neuroborreliose (Assous et al., 1993; van Dam et al., 1993).

1.2.3 Diagnostik

Zur Sicherung bzw. Unterstützung der klinischen Diagnose Lyme-Borreliose, ist der Goldstandard die kulturelle Anzucht mit anschließender Isolierung des Erregers aus Patientenmaterial. Bei 50 % der primären und sogar 90 % der (bereits sehr charakteristischen) sekundären Erythema migrans-Läsionen gelingt die Anzucht der Erreger aus Hautbiopsiematerial (Melski et al., 1993; Schwartz et al., 1992). Eine Isolierung der Spirochäten aus Blut respektive Plasma während einer frühen Erkrankung gelingt in bis zu 48 % der Fälle. Selten dagegen ist eine Anzucht aus Liquor cerebrospinalis oder Gelenkpunktat möglich – vermutlich auf Grund der niedrigen Erregerdichte in diesen Körperflüssigkeiten.

Die Anzucht als relativ aufwendige und langwierige Diagnostik wird aus Hautbiopsaten bei atypischen Formen des Erythema migrans bei Verdacht auf Borreliose oder bei Erythema migrans in Nicht-Endemiegebieten empfohlen. Der Versuch einer Isolierung aus dem Vollblut oder Plasma wird bei Patienten mit hohem Risiko für früh disseminierte Borreliose mit noch negativer Serologie diskutiert (Reed, 2002).

Zeigt ein Patient objektivierbare Symptome, so empfiehlt das American College of Physicians (ACP) die Anwendung immunologischer Methoden zur Unterstützung der klinischen Diagnose (American College of Physicians, 1997). Hierfür stehen die hochsensitiven Methoden ELISA oder IFA (indirekter Immunfluoreszenztest) zur Verfügung, als spezifischere Methode der Westernblot. Die CDC empfiehlt für die USA eine Zwei-Stufen Diagnostik mit ELISA oder IFA als Suchtest und dem Westernblot mit standardisierter Auswertung als Bestätigungstest (CDC, 1997).

Für Europa ist auf Grund der verschiedenen Genospezies und der signifikanten Antigenvariation die Interpretation der Befunde komplexer und in der Befundinterpretation sollten die vor Ort endemischen Genotypen berücksichtigt werden (Hauser et al., 1997; Robertson et al., 2000). Für Deutschland wurden vom Nationalen Referenzzentrum für Borrelien Richtlinien für das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf Lyme-Borreliose herausgegeben (Fingerle und Wilske, 2007). Auch hier wird ein zweistufiges Vorgehen mit einem ELISA als Suchtest und einem Immunoblot als Bestätigungstest empfohlen, wobei für letzteren komplexe, Stamm-spezifische Interpretationskriterien gelten.

Generell sollte auf spezifische IgM- und IgG-Antikörper untersucht werden, wobei die Titer beider Antikörpersubtypen über Jahre nach Infektion, auch nach antimikrobieller Therapie persistieren können (Wilske et al., 2007).

Kreuzreaktionen bei den serologischen Verfahren sind relativ häufig und können unter anderem bei Autoimmunerkrankungen, infektiöser Mononukleose, Endokarditis, Syphilis und Infektionen mit anderen Spirochäten sowie mit *Helicobacter pylori* auftreten.

Mehr und mehr wird nach Methoden zur molekularen Borreliendiagnostik geforscht. Am weitesten verbreitet sind hierbei Methoden mit dem Versuch der Amplifikation von Borrelien-spezifischen Genabschnitten aus Blut-, Liquor-, Gelenksflüssigkeits- und Urinproben mittels PCR. Sensitivität und Spezifität dieses Verfahren sind für Haut-, Serum- und Gelenksflüssigkeitsproben gut (s. Tab. 1.5). Oft kann jedoch in den Geweben persistierende Erreger-DNA auch unter effektiver antimikrobieller Therapie über Wochen nachweisbar sein, so dass eine Therapiekontrolle bisher auch mit dieser Methode nicht möglich ist (Reed, 2002).

Probenmaterial	Sensitivität	Spezifität
Hautbiopsie (EM)	68 %	100 %
Blut o. Plasma	9,5 - 40 %	-
Gelenkspunktat	73 %	99 %
Liquor cerebrospinalis	20 %	-
Urin	13 - 100 %	-

Tab. 1.5, Mittlere Sensitivität und Spezifität des Nachweises von Borrelien-DNA aus verschiedenen Materialien mittels PCR, - keine Angabe (entnommen aus Dumler, 2001; Schwartz et al., 1992; Wilske et al., 2007)

1.2.4 Therapie und Prognose

Die in den Leitlinien der Infectious Diseases Society of America empfohlene Therapie ist in den Tab. 1.6 und 1.7 dargestellt. Sowohl Beta-Lactam-Antibiotika als auch Tetracycline sind gegen Borrelien gut wirksam. Die Therapieform und Dauer ist abhängig vom Stadium und der Schwere der Erkrankung.

Indikation	Therapieform	Dauer [Tage]
asymptomatischer Zeckenstich	keine	-
Erythema migrans	oral	14-21
Borrelien-Lymphozytom	oral	14
Akute neurologische Symptomatik		
Akute Meningitis oder Radikulopathie	parenteral	14-28
Akute Fazialisparese	oral	14-21
Kardiale Symptomatik		
AV-Block I. oder II. Grades	oral	14-21
AV-Block III. Grades	parenteral	14-21
Spätsymptome		
Arthritis mit neurologischen Symptomen	oral	28
Wiederkehrende Arthritis nach oraler Therapie	oral	28
	oder parenteral	14-28
Persistierende Arthritis nach zwei Therapiezyklen	symptomatisch	
Erkrankung des zentralen oder peripheren Nervensystems	parenteral	14-28
Chronische Borreliose oder Post-Lyme Erkrankung	symptomatisch	

Tab 1.6, Empfehlungen zur Behandlung der Lyme-Borreliose (modifiziert nach Nadelman und Wormser, 1998; Wormser et al., 2000)

Medikament	Dosis für Erwachsene [pro Tag]	Dosis für Kinder [pro Tag]
Oral		
1. Wahl		
Amoxicillin oral	3 x 500 mg	50 mg/kg in 3 Dosen (max. 500 mg/Dosis)
Doxycyclin ^a	2 x 100 mg	< 8 Jahre nicht empfohlen; ≥ 8 J. 2 x 1-2 mg/kg (max. 100 mg/Dosis)
2. Wahl		
Cefuroxim axetil	2 x 500 mg	30 mg/kg in 2 Dosen (max. 500 mg/Dosis)
Parenteral		
1. Wahl		
Ceftriaxon	1 x 2 g	1 x 75-100 mg/kg (max. 2 g)
2. Wahl		
Cefotaxim	3 x 2 g	150-200 mg/kg in 3 oder 4 Dosen (max. 6 g/Tag)
Penicillin G ^b	18-24 Millionen Einheiten in 6 Dosen	200000-400000 Einheiten/kg in 6 Dosen (max. 18-24 Millionen Einheiten)

^a Tetracycline sind bei schwangeren oder stillenden Frauen relativ kontraindiziert.

^b Die Penicillin-Dosis muss bei eingeschränkter Nierenfunktion reduziert werden.

Tab 1.7, Medikamente in der Behandlung der Lyme-Borreliose (modifiziert nach Wormser et al., 2000)

Die Ergebnisse der Behandlung der akuten Stadien der Lyme-Borreliose, einschließlich neurologischer Symptomatik, sind zufriedenstellend. Bei mehr als 90 % der Patienten sind nach erfolgter Therapie keine objektiven Symptome mehr vorhanden, Rückfälle sind selten.

Dem entgegen steht die relativ schlechte Prognose der Symptome der chronischen Neuroborreliose, die oft nur langsam rückläufig sind und über Monate bis Jahre persistieren können.

Auch die Lyme-Arthritis spricht oft auf eine antimikrobielle Therapie schlecht an. 10 % der Patienten in den USA haben persistierende Gelenkentzündungen über Monate oder sogar Jahre (Steere, 2001).

Auch nach angemessener Behandlung hat ein kleiner Prozentsatz der Patienten bleibende subjektive Symptome wie Gelenkschmerzen, neurokognitive Defizite oder Abgeschlagenheit. Diese Erkrankung wird als Post-Lyme-Syndrom bezeichnet.

1.2.5 Prophylaxe

Um die Infektion mit Borrelien zu verhindern, wird empfohlen, mit Zecken verseuchte Gebiete zu meiden und in Gebieten mit potentielltem Zeckenvorkommen geeignete lange Kleidung zu tragen. Auch die Anwendung von Repellentien vermittelt einen gewissen Schutz. Nach dem Aufenthalt im Freien, sollte man den Körper nach Zecken absuchen und diese entfernen. Die Einstichstelle sollte anschließend gründlich desinfiziert werden.

Eine Chemoprophylaxe nach Zeckenstich wird auf Grund des geringen Übertragungsrisikos der Spirochäten und dem im Verhältnis dazu hohen Risiko einer Arzneimittelreaktion nicht empfohlen.

Ein Impfstoff steht derzeit für Menschen nicht zur Verfügung. In den USA war für wenige Jahre ein wirksamer rekombinanter Impfstoff basierend auf dem Oberflächenantigen OspA eingeführt. Die Impfung mit drei Dosen verhinderte in 76 % der Fälle eine symptomatische Infektion (Poland und Jacobson, 2001). Das Medikament wurde jedoch im Februar 2002 aus kommerziellen Gründen vom Markt genommen.

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Lyme-Erkrankung ist Gegenstand intensiver Forschung, jedoch in Europa auf Grund der hohen Erregervariabilität schwierig (Robert Koch Institut, 2007).

1.3 *Borrelia lusitaniae*

Die Erstbeschreibung und Charakterisierung von *B. lusitaniae* als neuer Borrelienspezies erfolgte 1997 durch Anne le Fleche et al. (Le Fleche et al., 1997).

Anhand der Analyse des hochkonservierten 16S rRNA Genlocus, stellt sich *B. lusitaniae* als eigenständige Genospezies dar, die am nächsten mit *B. garinii* verwandt ist (s. Abb. 1.3).

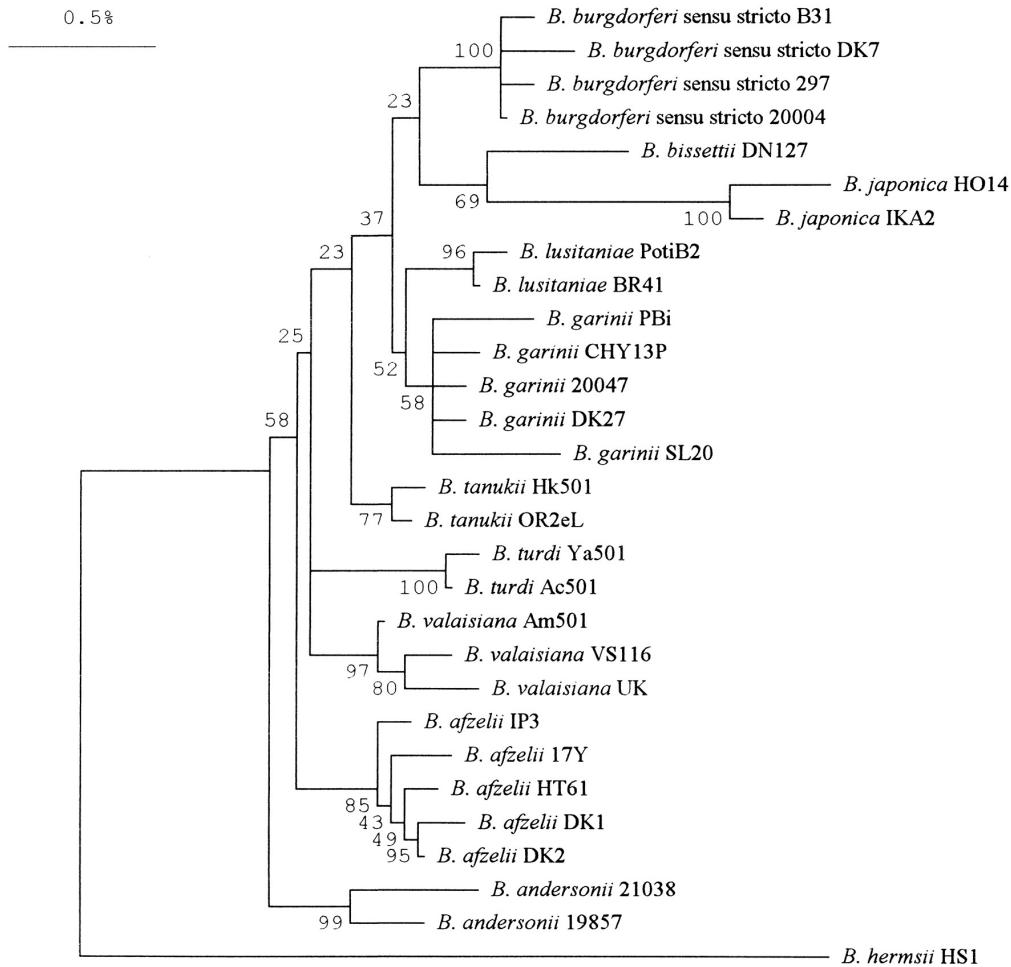


Abb. 1.3, Phylogenetischer Stammbaum der Borrelien, konstruiert nach Sequenzanalyse des 16S rRNA-Locus (entnommen aus Wang et al., 1999b)

1.3.1 Ökologie

B. lusitaniae wurde bisher nur in Europa und Nordafrika isoliert. Hierbei wurden die Bakterien in Zecken aus der Schweiz (Jouda et al., 2002, 2004a, 2004b; Poupon et al., 2006), Weißrussland, Frankreich (Richter et al., 2003), Tschechien, Moldawien, Portugal, der Ukraine, der Türkei, Spanien (Barral et al., 2002), der Slowakei (Gern et al., 1999), Polen, Deutschland (Richter und Matuschka, 2006), Marokko (Sarih et al., 2003) und Tunesien (Younsi et al., 2001; Zhioua et al., 1999) nachgewiesen. In Nordafrika und Portugal stellt *B. lusitaniae* die bei weitem überwiegende bzw. sogar einzige Borrelienspezies dar, die bisher gefunden wurde (De Michelis et al., 2000; Sarih et al., 2003; Younsi et al., 2001; Zhioua et al., 1999). Außerhalb der letztgenannten Gebiete kommen *B. lusitaniae* nur in relativ eng umschriebenen Regionen vor. Die Länder, in denen *B. lusitaniae* aus Zecken isoliert wurde, sind in Abb. 1.4 dargestellt.



Abb. 1.4, Geographisches Vorkommen von *B. lusitaniae* in Europa (mit Stern markierte Länder)

Das Reservoir von *B. lusitaniae* stellen Eidechsen dar, wobei verschiedene Arten identifiziert wurden, die hierbei eine Rolle spielen: die Mauereidechse (*Podarcis muralis*) (Amore et al., 2007; Richter und Matuschka, 2006), als auch die Zauneidechse (*Lacerta agilis*) (Majláthová et al., 2008; Richter und Matuschka, 2006), die Smaragdeidechse (*Lacerta viridis*) (Majláthová et al., 2006) und der algerische Sandläufer (*Psammmodromus algirus*) (Dsouli et al., 2006). Der Nachweis von *B. lusitaniae* in Zugvögeln in der Schweiz lassen zusätzlich vermuten, dass diese Genospezies durch Vögel über weitere Strecken in andere Regionen verschleppt werden, wo sie sich dann, wie bei einem Reservoir in Eidechsen zu vermuten, wiederum in eng umschriebenen Gebieten verbreiten (Poupon et al., 2006; Vitorino et al., 2008).

Wie bereits beschrieben, wird *B. lusitaniae* bisher nur in Portugal und Nordafrika mit Regelmäßigkeit in Zecken gefunden. Phylogenetische Studien legen einen Ursprung der Art in Portugal nahe, von wo sie vermutlich in die anderen Regionen Europas und nach Nordafrika gelangten (Younsi et al., 2005).

1.3.2 Pathogenität von *B. lusitaniae*

B. lusitaniae wurde bisher in zwei Fällen vom Menschen isoliert, in beiden Fällen handelte es sich um Patienten aus Portugal.

Der erste Fall wurde im Jahr 2005 von Isabel da Franca et al. publiziert (da Franca et al., 2005). Es handelte sich hierbei um eine 46-jährige portugiesische Patientin mit einer asymptomatischen Hautläsion am Oberschenkel, welche eine Acrodermatitis chronica atrophicans vermuten lies. Die Patientin berichtete außerdem über die folgenden Symptome: persistierende Kopfschmerzen, Parästhesien in den Händen, vorwiegend nächtliche Krämpfe am Körperstamm und Palpitationen. Der Patientin waren weder ein Zeckenstich noch eine Hautrötung im Sinne eines Erythema migrans Erinnerung, jedoch ließen ihre Lebensumstände anamnestisch auf Kontakt zu Zecken schließen.

Aus einer gewonnenen Biopsie aus der Hautläsion der Patientin wurde der Stamm PoHL1 kultiviert und durch Genotypisierung der Spezies *B. lusitaniae* zugeordnet (Collares-Pereira et al., 2004).

Der zweite Fall wurde im Jahr 2008 von Lopes de Carvalho et al. (de Carvalho et al., 2008) veröffentlicht. Hierbei handelte es sich um ein 13-jähriges portugiesisches Mädchen mit Schwellung, Schmerz, Zyanose und Paraesthesien des dritten, vierten und fünften Fingers der rechten Hand sowie einem intermittierenden Vaskulitis-ähnlichen punktförmigen Erythem.

Die Kultivierung von Spirochäten gelang aus einer 500 µl Vollblutprobe der Patientin, wobei die Genotypisierung die Spezies *B. lusitaniae* ergab.

Weitere Assoziationen zwischen klinischen Symptomen und *B. lusitaniae* wurden beschrieben, welche ein humanpathogenes Potential der Borrelienspezies vermuten lassen:

Ein klinischer Bericht aus Tunesien beschreibt Patienten mit neurologischen und artikulären Symptomen, die vereinbar mit dem Krankheitsbild einer Lyme-Borreliose waren. Sie wurden serologisch im ELISA positiv auf *B. burgdorferi* s.l. getestet (Aoun et al., 1998). Da *B. lusitaniae* in Nordafrika die weitaus am häufigsten aus Zecken isolierte Borreliengenospezies ist, lässt dieser Bericht auf *B. lusitaniae* als Krankheitserreger schließen.

Auch eine Doktorarbeit aus Portugal beschreibt die mehrfache Identifizierung von *B. lusitaniae*-DNA mittels PCR in Hautbiopsien von Patienten mit Erythema migrans (da Franca, 2004).

Eine weitere interessante Untersuchung wurde von Nordin S. Zeidner et al. im Jahr 2001 veröffentlicht (Zeidner et al., 2001). Sie infizierten C3H/HeN-Mäuse mit dem portugiesischen *B. lusitaniae* Zeckenisolat PotiB2. Innerhalb von 28 Tagen konnten sie eine multifokale, lymphoide interstitielle Zystitis und eine Entzündungen des Herzens im Sinne einer Endarteriitis der Aorta, welche durch die Gefäßwand in das angrenzende Myokard übergriff,

induzieren. Dieser Versuch demonstriert eindrücklich das pathogene Potential von *B. lusitaniae* im Mausmodell.

Die veröffentlichten Ergebnisse liefern wichtige Hinweise, dass *B. lusitaniae* pathogenes Potential besitzt. Unter welchen Bedingungen dieses für den Menschen von Bedeutung ist, ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Forschung.

1.4 Das Komplementsystem

1.4.1 Aufbau und Nomenklatur

Das Komplementsystem besteht aus ca. 40 hitzelablen Serum- und membrangebundenen Proteinen, die in ihrer Gesamtheit über 3 g pro Liter Serum oder ca. 15 % der Globulin-Fraktion im Serum ausmachen.

Die Nomenklatur der Proteine des klassischen Weges erfolgte nach der historischen Reihenfolge ihrer Isolierung als C1, C2 usw., die Nummerierung ist somit nicht immer kongruent mit der Reihenfolge ihrer Aktivierung. Die Proteine des alternativen Weges werden als Faktoren in Kombination mit einem Buchstaben bezeichnet, z.B. Faktor B.

1.4.2 Funktion des Komplementsystems

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunität. Als solches besitzt es drei Hauptaufgaben. Eine Übersicht gibt Tab. 1.8.

1. **Verteidigung des Wirtes gegen eingedrungene Mikroorganismen.** Dieser Mechanismus ist v. a. bei der Abwehr von gramnegativen Erregern von Bedeutung. Im Einzelnen kann das Komplement durch kovalente Bindung von Fragmenten der Komponenten C3 und C4 an die Oberfläche von Erreger die Phagozytose einleiten. Dieser Vorgang wird als Opsonisierung bezeichnet. Die Spaltprodukte C3a, C4a und C5a wirken als Anaphylatoxine und sind wichtig für Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten. Das Komplementsystem kann Zellen auch direkt lysieren. Dies wird durch Porenbildung durch die Integration des aus den Komponenten C5b bis C9 bestehenden Komplexes in die Zellmembran des Erregers ermöglicht. Diese Pore wird als terminaler Membranangriffskomplex (MAC) oder terminaler Komplementkomplex (TCC) bezeichnet.

2. Das Komplementsystem stellt außerdem ein **Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität** dar. Hierbei verstärkt es zum einen die Antikörperantwort, zum anderen verstärkt es das immunologische Gedächtnis. Dies erfolgt über Immunkomplexe,

welche mit C3b und C4b beladen sind und so von C3-Rezeptoren auf B-Zellen, Antigen-präsentierenden Zellen bzw. follikulären dendritischen Zellen erkannt werden.

3. Wichtig für den Wirtsorganismus ist außerdem die Rolle des Komplementsystems beim **Abbau von Immunkomplexen oder von Fragmenten apoptotischer Zellen**. Diese werden nach Markierung durch C1q oder kovalent gebundenes C3 und C4 durch Phagozyten aufgenommen und abgebaut (Walport, 2001).

Funktion	Beteiligte Komplementkomponenten
Erregerabwehr:	
Opsonisierung	Kovalent gebundenes C3b und C4b
Chemotaxis	C3a, C4a, C5a
Aktivierung von Leukozyten	
Lyse von Bakterien und Zellen	Terminaler Membranangriffskomplex C5b-C9 (MAC)
Verbindung angeborene-erworbene Immunität	
Verstärkung der Antikörperbildung	C3b, C4b
Verstärkung des immunologischen Gedächtnisses	C3b, C4b
Abbau von Abfall	
Abbau von Immunkomplexen	C1q, C3b, C4b
Abbau apoptotischer Zellen	C1q, C3b, C4b

Tab. 1.8, Übersicht über die Funktionen des Komplementsystems und beteiligte Proteine (modifiziert nach Walport, 2001)

1.4.3 Aktivierung des Komplementsystems

Das Komplementsystem kann über drei Wege aktiviert und so die Komplementkaskade angestoßen werden: den klassischen Weg, den Lektin-Weg und den alternativen Weg (s. Tab. 1.9).

Aktivierungsweg:	Reihenfolge beteiligter Proteine:
Klassischer Weg	C1, C4, C2, C3
Lektin Weg	MBL, MASP1/MASP2, C3
Alternativer Weg	Faktor B, Properdin, Faktor D, C3

Tab. 1.9, Aktivierung der Komplementkaskade

Der **klassische Weg** wird hauptsächlich durch Bindung von Antikörpern der Subklassen IgM und IgG2b an Bakterienoberflächen eingeleitet. C1q bindet an den Fc-Teil des Antikörpers und wird so aktiviert. Die Untereinheit C1s wird nun enzymatisch aktiv und spaltet C4 in C4a und C4b. C4b lagert sich auf Bakterien ab und bindet dort C2. Von diesem wird nun das kleine Fragment C2b abgespalten und der verbleibende Komplex aus C4b und C2a bildet die

C3-Konvertase des klassischen Weges. Dieses Enzym ist nun in der Lage, C3 in C3a und C3b zu spalten.

Die Aktivierung des klassischen Weges ist auch ohne die Mitwirkung von Antikörpern durch die Bindung und Aktivierung von C1q durch Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien möglich (Loos und Clas, 1987).

Der **Lektin-Weg** wird durch die spezifische Erkennung von Mannose-binding Lectin (MBL) oder Ficolinen von Kohlenhydraten auf pathogenen Mikroorganismen aktiviert. Durch die Bindung werden die Mannose-binding Lectin assoziierten Serinproteasen MASP1 und MASP2 aktiviert, welche C4 und C2 spalten. Durch die Bildung der C3-Konvertase C4b2a mündet der Lektin-Weg in den klassischen Weg der Komplementaktivierung.

Die **Aktivierung des alternativen Weges** wird durch die spontane Konformationsänderung von C3 eingeleitet und geschieht somit zu jeder Zeit an jedem Ort im Körper unter Anwesenheit von C3. Dieses Protein befindet sich in einer Konzentration von 1,4 mg/ml im Serum und ist im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten vorhanden. Die intermediäre Form von C3 ist in der Lage Faktor B zu binden. Wird dieser nun durch Faktor D gespalten, entsteht die C3-Konvertase C3(H₂O)Bb, welche nun C3 in C3a und das hochreaktive C3b spaltet. Ein weiterer Verstärkungsschritt der Aktivierung ergibt sich durch die Formierung der C3-Konvertase C3bBb durch Bindung von C3b an Faktor B und anschließende Spaltung durch Faktor D. Die Bildung von C3b wird somit explosionsartig verstärkt (Zipfel et al., 2006).

Alle drei Wege münden gemeinsam in der **Aktivierung der terminalen Sequenz** durch Spaltung von C3 in C3a und C3b. C3 stellt somit ein Schlüsselement der Komplementkaskade dar. Große Mengen C3b-Moleküle werden am Ort der Aktivierung auf den Zelloberflächen eingedrungener Erreger abgelagert, die so als „fremd“ erkannt werden.

Im weiteren Verlauf lagert sich auch C3b an die C3-Konvertase des klassischen Weges, einem Komplex aus C4b und C2a, an und es entsteht so die C5-Konvertase des klassischen Weges. Die C5-Konvertase des alternativen Weges entsteht durch die Assemblierung der C3-Konvertase und C3b. Die C5-Konvertasen spalten C5 in das Anaphylatoxin C5a und das größere Fragment C5b, welches die Formierung des terminalen Membranangriffskomplexes mit den weiteren Komponenten C6, C7, C8 und C9 einleitet. Dieser Komplex integriert sich als Pore in der bakteriellen Zellmembran, was letztendlich zur Lyse des Bakteriums führt (s. Abb. 1.5).

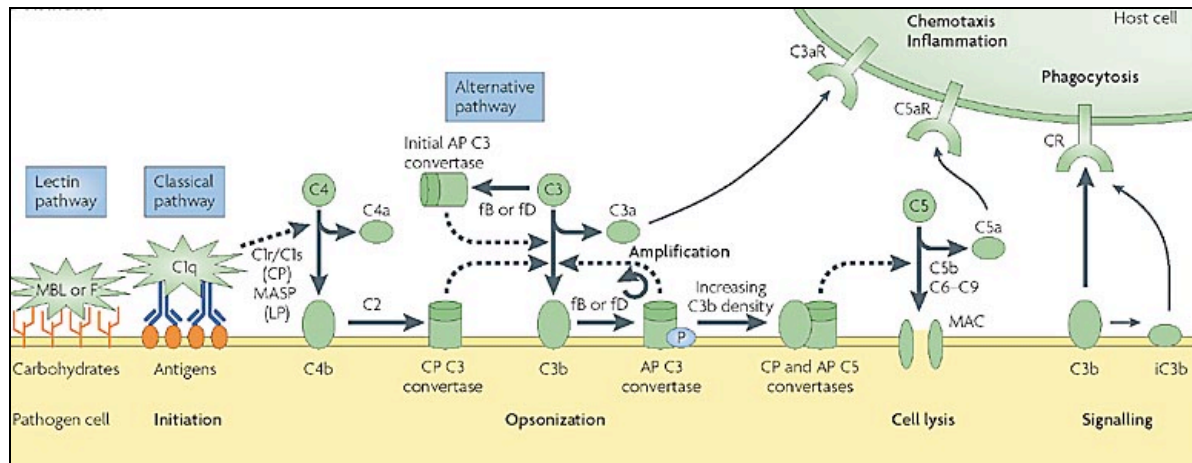


Abb. 1.5, Ablauf der Komplementkaskade (entnommen aus Lambris et al., 2008).

1.4.4 Regulation des Komplementsystems

Die Regulation des Komplementsystems ist essentiell für den Erhalt der Unversehrtheit des Körpers. Da der alternative Weg einer spontanen Aktivierung unterliegt, unterscheidet diese nicht zwischen Oberflächen von Erregern und körpereigenen Zellen. Die eigenen Zellen müssen also Möglichkeiten besitzen, den Ablauf der Komplementkaskade frühzeitig zu stoppen, bevor die explosionsartige Amplifikation der zerstörerischen C3b-Moleküle erfolgt. Gleichzeitig darf auf der anderen Seite die Zerstörung eingedrungener Mikroorganismen nicht beeinträchtigt werden.

Die Feinstregulierung der Komplementaktivierung zum Schutz der Körperzellen geschieht durch mehrere Regulatoren. Sie sind zum Teil Bestandteil der körpereigenen Zelloberflächen und zum Teil als lösliche Proteine im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten vorhanden. Membranständige Komplementregulatoren des alternativen Weges sind Complement Receptor 1 (CR1, CD35), Membrane Cofactor Protein (MCP, CD46), Decay-accelerating Factor (DAF, CD55) und CD59. Als lösliche Regulatoren sind beim Menschen Faktor H, Factor-H-like Protein-1 (FHL-1) und das C4 bindende Protein (C4BP) von Bedeutung. Die Aktivitäten der Komplementregulatoren sind zum Teil überlappend und redundant und bestehen im Einzelnen in den folgenden Fähigkeiten:

1. Hemmung der Zusammenlagerung der C3-Konvertase,
2. Inaktivierung von abgelagertem C3b durch die Serinprotease Faktor I in Kooperation mit den Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1 und C4BP (Kofaktoraktivität) (s. Abb. 1.6).
3. Die Beschleunigung des Zerfalls der C3-Konvertase (Decay Accelerating-Activity) (Kraiczky und Würzner, 2006; Lambris et al., 2008; Zipfel et al., 2006).

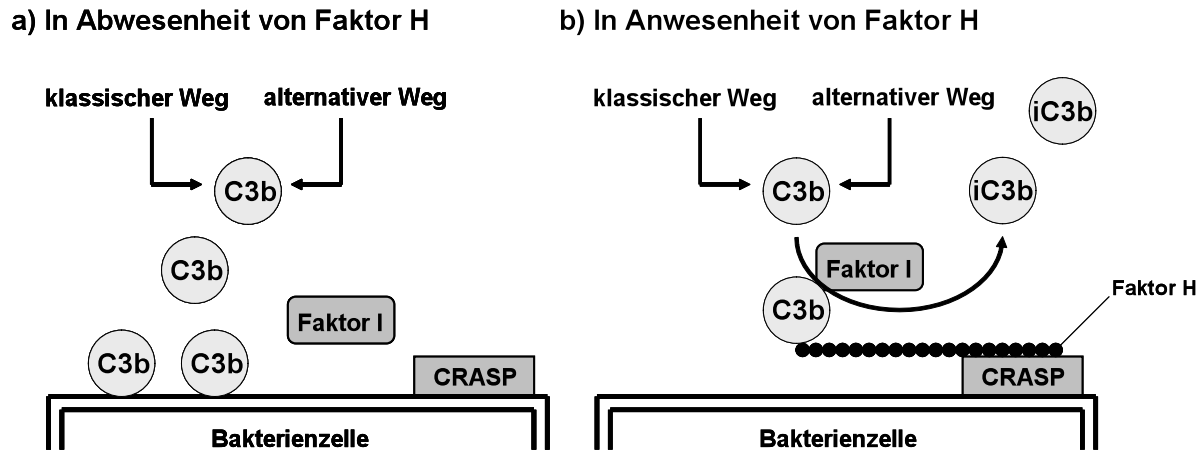


Abb. 1.6, Schematische Darstellung der Komplementinhibition durch Faktor H und Faktor I

1.4.5 Die Faktor H-Proteinfamilie

Faktor H, ein Komplementregulator des alternativen Weges, ist ein 150 kD großes Protein und kommt in einer Konzentration von 500 µg/ml im Serum und anderen Körperflüssigkeiten gelöst vor.

Es ist aus 20, sich individuell faltenden Proteindomänen, den sog. short consensus repeats (SCRs) aufgebaut.

Für seine Aufgaben bei der Komplementregulation konnten den SCRs 1-4 die Kofaktor- und Decay Accelerating-Activity zugeordnet werden. Faktor H kann außerdem C3b, Heparin und C-reaktives Protein (CRP) binden. Die Bedeutung hiervon ist jedoch bisher noch Bestandteil intensiver Forschung.

FHL-1 entsteht durch Spaltung des Transkripts des Faktor H kodierenden Gens und besitzt ein Molekulargewicht von 42 kD. Seine Konzentration im Serum beträgt 50 µg/ml, somit nur ca. ein Zehntel dessen von Faktor H. Dieses Glykoprotein besteht aus den gleichen sieben N-terminalen SCRs wie Faktor H, besitzt jedoch zusätzlich am C-Terminus vier hydrophobe Aminosäuren (Serin-Phenylalanin-Threonin-Leucin). FHL-1 ist ebenfalls ein potenter Regulator des alternativen Weges des Komplementsystems (Zipfel und Skerka, 1994; Zipfel et al., 2002).

Des Weiteren gehören zur Faktor H-Proteinfamilie die Faktor H related Proteins 1-5 (FHR1-5). Sie werden von individuellen Genen kodiert und sind aus bis zu neun SCRs aufgebaut, die in ihrer Aminosäuresequenz zu SCRs von Faktor H und FHL-1 homolog sind. Hierbei beträgt die Identität der einzelnen SCRs 32 % bis 100 %. Für die drei am C-Terminus

gelegenen SCRs von FHR-1 ergeben sich Identitäten von 100%, 100% und 97% im Vergleich mit den SCRs 18-20 von Faktor H (s. Abb. 1.7).

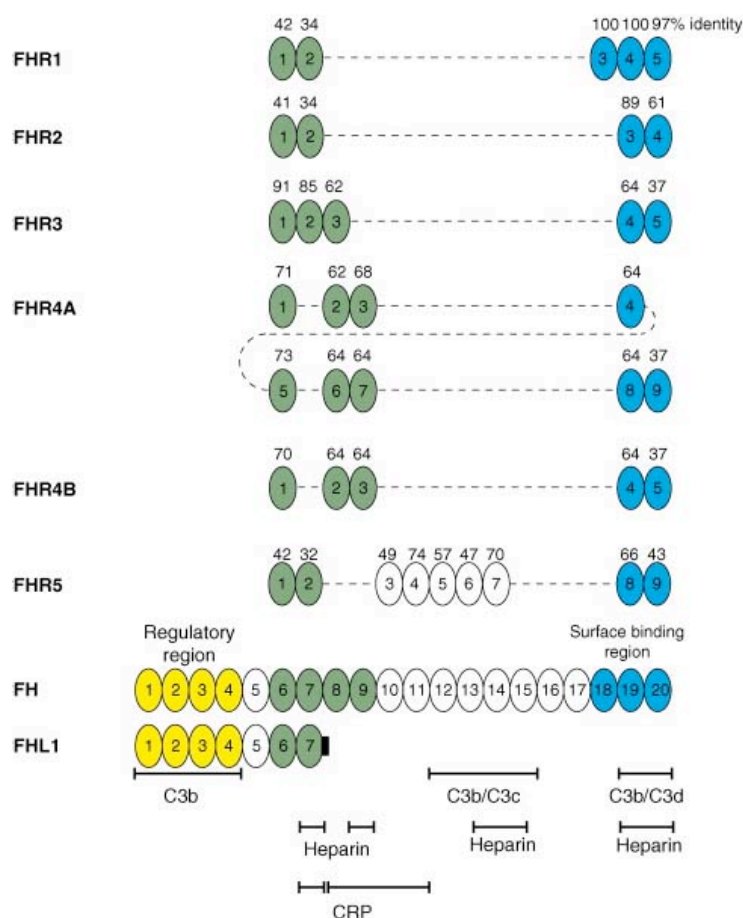


Abb. 1.7, Aufbau der Proteine der Faktor H-Familie (modifiziert nach Józsi und Zipfel, 2008)

1.5 Komplementresistenz als Virulenzfaktor bei Mikroorganismen

1.5.1 Serumresistenz durch Bindung von Komplementregulatoren

Die Fähigkeit eines Mikroorganismus, der bakteriziden Wirkung von Komplement zu entgehen und im Serum zu überleben, wird als Serumresistenz bezeichnet.

Eine von zahlreichen Strategien, Serumresistenz zu erlangen, besteht in der Bindung löslicher Komplementregulatoren an die Mikrobenoberfläche (Kraiczky und Würzner, 2006; Lambris et al., 2008). Ähnlich den Körperzellen machen sich die Erreger die hemmende Wirkung von Faktor H, FHL-1 oder C4BP auf die Aktivierung des Komplementsystems zu nutze. So werden in den Körper eingedrungene Mikroorganismen nicht frühzeitig durch die angeborene Immunität des Wirts zerstört, sondern können sich hämatogen im Organismus verteilen und

so eine disseminierte Infektion verursachen. Somit stellt die Serumresistenz einen bedeutenden Virulenzfaktor dar.

Der hier beschriebene Mechanismus ist bei gram-positiven, wie gram-negativen Bakterien weit verbreitet, wie z. B. bei Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken, Neisserien, Yersinien und Borrelien. Aber auch bei Viren (z.B. *HIV-1*), bei Pilzen (z.B. *Candida albicans*, *Aspergillus*) und bei Parasiten (z.B. *Echinococcus spp.*, *Onchocerca volvulus*) wurde die Fähigkeit zur Bindung von Komplementregulatoren an der Bakterienoberfläche gezeigt (Kraiczy und Würzner, 2006; Lambris et al., 2008).

Borrelien unterscheiden sich in Hinblick auf ihre Fähigkeit Komplement zu aktivieren und der Lyse durch Komplement zu entgehen. Im Allgemeinen sind die meisten *B. afzelii*- und *B. spielmanii*-Isolate resistent gegen die Komplement vermittelte Lyse, während die Mehrzahl der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate einen intermediär resistenten Phänotyp aufweisen. Im Gegensatz hierzu werden die meisten *B. garinii*-Isolate als serumsensibel eingestuft (Brade et al., 1992; Breitner-Ruddock et al., 1997; Herzberger et al., 2007; Kraiczy et al., 2002; van Dam et al., 1997).

Die Serumresistenz von Borrelien kann als Pathogenitätsfaktor angesehen werden. Die Fähigkeit, gegenüber der bakteriolytischen Wirkung des Komplementsystems resistent zu sein, ermöglicht es den Spirochäten, vom Ort des Zeckenstichs hämatogen zu disseminieren und an die verschiedensten Orte im Körper zu gelangen.

Die serumsensiblen Borrelienspezies aktivieren sowohl den alternativen Weg, als auch den klassischen Weg in Abwesenheit von Antikörpern (Breitner-Ruddock et al., 1997; Kraiczy et al., 2000; van Dam et al., 1997).

1.5.2 Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins (CRASPs) von *B. burgdorferi*

Serumresistente Borrelien sind in der Lage die Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 sowie FHR-1 an ihrer Oberfläche zu binden. Die hierfür verantwortlichen Proteine wurden als Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins (CRASPs) bezeichnet (Kraiczy et al., 2001b). Sie wurden entsprechend ihres Molekulargewichts von 1-5 nummeriert, gleichzeitig steht ein Buchstabenkürzel für die Borrelienspezies, bei welcher das Protein entdeckt wurde. Bb steht hierbei für *Borrelia burgdorferi*, Ba für *B. afzelii* und Bs für *B. spielmanii*.

CRASPs sind keine einheitlichen Proteine. Sie werden anhand ihrer Bindungseigenschaften in drei Gruppen eingeteilt. CRASPs der Gruppe 1 sind in der Lage, Faktor H und FHL-1 zu binden (z.B. BbCRASP-1 und -2, BaCRASP-1 und -2, BsCRASP-1), die der Gruppe 2 binden

nur FHL-1 (BaCRASP-3) und die der Gruppe 3 Faktor H und FHR-1 (z.B. BbCRASP-3 bis -5, BaCRASP-4 und -5) (Haupt et al., 2007; Kraiczy et al., 2002).

Sowohl die Expression von BbCRASP-1 als auch von BbCRASP-2 allein führt bei Borrelien zur Serumresistenz. Daher stellen diese Proteine die wichtigsten Moleküle dar, um der Komplement-vermittelten Lyse zu entgehen (Brooks et al., 2006; Kenedy et al., 2009; Siegel et al., 2008). Das BbCRASP-1 kodierende *cspA*-Gen ist auf dem linearen Plasmid lp54 lokalisiert und gehört zur pgf54 Familie (Casjens et al., 2000; Wallich et al., 2005). Von den insgesamt 14 Mitgliedern dieser Proteinfamilie bindet nur BbCRASP-1 die beiden Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1. Es ist auch das einzige CRASP-Protein, dessen dreidimensionale Struktur aufgeklärt ist (Cordes et al., 2005). BbCRASP-2 ist das Produkt des *cspZ*-Gens, welches auf dem linearen Plasmid lp28-3 lokalisiert ist. Auch BbCRASP-2 bindet Faktor H und FHL-1 (Hartmann et al., 2006; Rogers und Marconi, 2007; Siegel et al., 2008).

Anders verhält es sich jedoch mit BbCRASP-3, -4 und -5. Sie gehören zu der polymorphen Erp (OspE/F-related)-Proteinfamilie und ihnen ist gemeinsam, dass sie für sich alleine nicht in der Lage sind, eine vollständige Serumresistenz zu vermitteln.

Die verschiedenen CRASPs werden während des komplexen Infektionszyklus zu verschiedenen Zeitpunkten im Wirt exprimiert, wie in Abb. 1.8 dargestellt.

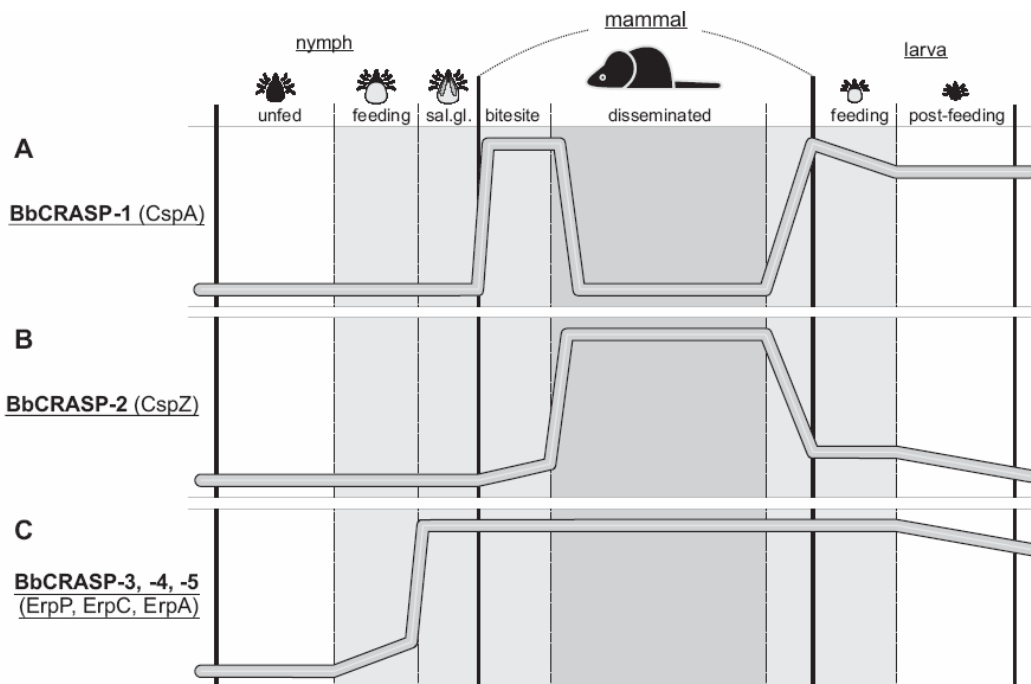


Abb. 1.8, Verlauf der Expression von CRASPs zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionszyklus Zecke-Wirt (modifiziert nach Bykowski et al., 2008)

Untersuchungen mit *B. burgdorferi* zeigten keine Expression von CRASPs im Mitteldarm von Nymphen vor der Blutmahlzeit. Während der Blutmahlzeit und zum Zeitpunkt der Übertragung der Borrelien beginnt die Produktion von BbCRASP-3, -4 und -5, während BbCRASP-1 und -2 weiterhin auf kaum nachweisbarem Niveau stagnieren. An der Einstichstelle in der Haut des Wirts können anschließend deutlich BbCRASP-1 und BbCRASP-3, -4 und -5 nachgewiesen werden. Im Laufe der disseminierten Infektion bleibt die Expression von BbCRASP-3 bis -5, gemessen an der starken und wiederholt stimulierten Antikörperreaktion des Wirtes, dauerhaft hoch. Im Gegensatz dazu ist eine Expression des *cspA*-Gens ab zwei Wochen nach Infektion nicht mehr nachzuweisen. Die Expression von *cspZ* steigt dagegen kontinuierlich an und ist signifikant höher als bei Borrelien in der Zecke. Bei Übertragung der Borrelien von der Maus auf die saugende Larve ist die Expression von BbCRASP-1 wiederum hoch, während nur geringfügige Mengen BbCRASP-2 nachzuweisen ist. Die Erp-Proteine BbCRASP-3, -4 und -5 werden weiterhin stark exprimiert. Nachdem die Blutmahlzeit beendet ist und sich die Zecke vom Wirt gelöst hat, drosseln die Borrelien die Produktion aller CRASPs (Bykowski et al., 2008; Stevenson et al., 2006).

1.5.3 Erp-Proteine von *B. burgdorferi*

Alle bisher untersuchten Isolate des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes besitzen auf ihren zirkulären cp32 Plasmiden einen mono- oder bicistronischen Erp-Locus. Die hier lokalisierten Gene sind sehr heterogen. Rückfallfieber-Borrelien besitzen dagegen keinen Erp-Locus, was auf eine spezifische Bedeutung dieses Genortes für die Biologie der Lyme-Borrelien schließen lässt.

Die Proteine der Erp-Familie, zu denen auch BbCRASP-3/ErpP, BbCRASP-4/ErpC und BbCRASP-5/ErpA gehören, sind oberflächenexponierte Lipoproteine und ihre Aminosäuresequenz zeigt eine große Diversität (Stevenson et al., 2006).

Einige Erp-Proteine, wie z.B. BbCRASP-3/ErpP, BbCRASP-4/ErpC und BbCRASP-5/ErpA von *B. burgdorferi* binden Faktor H unter in vitro Bedingungen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Erp-Proteine Plasminogen binden (Brissette et al., 2009) und ErpX Laminin (Brissette et al., 2007). Eine Übersicht der Erp-Proteinfamilie ist in Abb. 1.9 dargestellt.

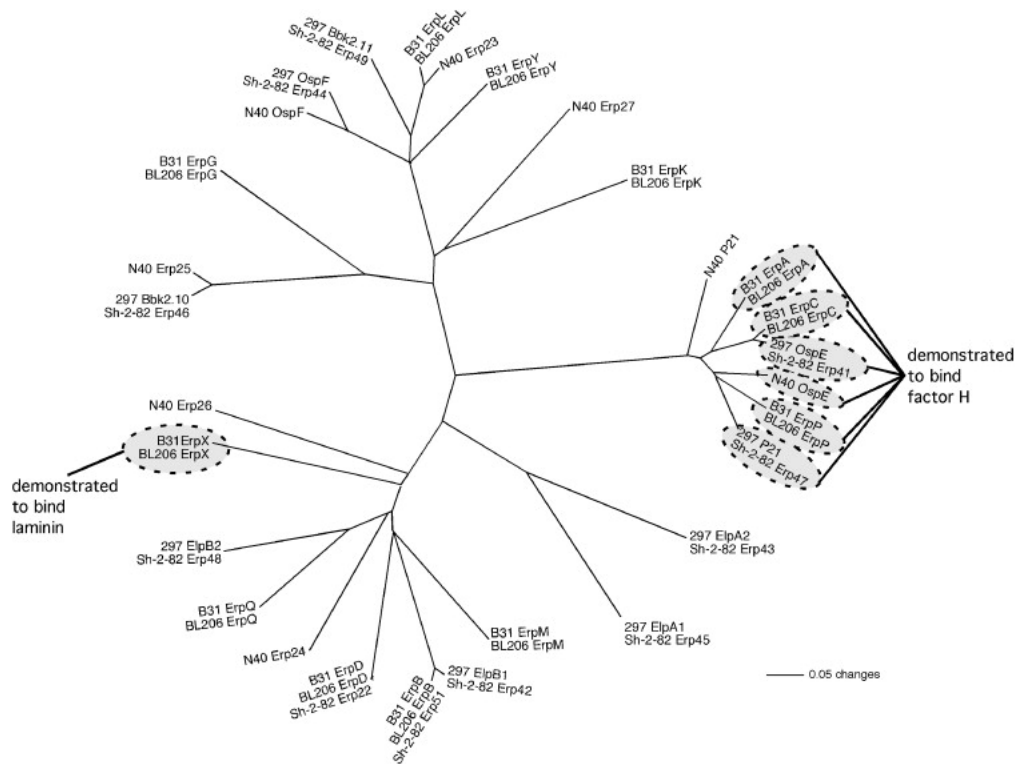


Abb. 1.9, Phylogramm der Erp-Proteinfamilie anhand der Aminosäuresequenz (entnommen aus Brissette et al., 2007)

1.6 Ziele dieser Arbeit:

Die Genospezies *B. lusitaniae* stellt eine bisher wenig untersuchte Spezies innerhalb des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes dar. Bisher konnte bezüglich der Rolle von *B. lusitaniae* als Krankheitserreger beim Menschen keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Es ist bekannt, dass die humanpathogenen Borrelienspezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. spielmanii* die Fähigkeit besitzen, mittels sog. CRASP-Proteine die humanen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 zu binden, was einen Mechanismus im Rahmen des Immunescapes dieser Borrelienspezies darstellt.

Vor diesem Hintergrund besteht ein besonderes Interesse darin, die Wechselwirkungen der Genospezies *B. lusitaniae* mit dem angeborenen menschlichen Immunsystem zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die folgenden Ziele bearbeitet werden:

1. Grundlegende Untersuchungen von *B. lusitaniae* zur Serumempfindlichkeit/ -resistenz gegenüber dem humanen Komplementsystem. Hierbei sollte im Besonderen der Frage nachgegangen werden, ob *B. lusitaniae* die Fähigkeit besitzt, die löslichen humanen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 zu binden und deren regulatorische Aktivität im Rahmen eines Immunescapes zu nutzen.
2. Identifizierung und Charakterisierung potentielle Faktor H und FHL-1 bindender Proteine.
3. Charakterisierung der kürzlich entdeckten Genospezies *B. lusitaniae* anhand des Plasmid- und Proteinprofils.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterien

2.1.1.1 Borrelien-Stämme

Genospezies	Stamm	Herkunft des Isolates
<i>B. lusitaniae</i>	SDA1-N1	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	MT-M3	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	MT-M5	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	MT-M7	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	MT-M8	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	MT-W4	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	MT-W16	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	MT-W17	<i>Ixodes ricinus</i> (Portugal)
	RBU Pm2-N6	<i>Ixodes ricinus</i> , die an Mauer- oder Zauneidechsen gesaugt haben (Süddeutschland)
	RBU La5-L2	<i>Ixodes ricinus</i> , die an Mauer- oder Zauneidechsen gesaugt haben (Süddeutschland)
	HHS La1-L3	<i>Ixodes ricinus</i> , die an Mauer- oder Zauneidechsen gesaugt haben (Süddeutschland)
	BBWS2-W2	wirtssuchende <i>Ixodes ricinus</i> (Süddeutschland)
	ZWU3-N4	wirtssuchende <i>Ixodes ricinus</i> (Süddeutschland)
	ZWS-W1	wirtssuchende <i>Ixodes ricinus</i> (Süddeutschland)
	IP-N1	wirtssuchende <i>Ixodes ricinus</i> (Süddeutschland)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	PoHL1	humanes Hautisolat (Portugal)
	LW2	humanes Hautisolat (Deutschland)
<i>B. afzelii</i>	B31-e2	Zeckenisolat (USA)
	FEM1-D15	Hautisolat, kloniert (Deutschland)
<i>B. garinii</i>	G1	humanes Liquorisolat (Deutschland)
<i>B. spielmanii</i>	A14S	humanes Hautisolat (Niederlande)

2.1.1.2 *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft, Katalog Nr.
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Nr. K4500-40
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>relA1 supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lagI</i> ^q ΔZM15]	Promega, Nr. L2001

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primär-Antikörper

Antikörper	Herkunft
für Westernblot:	
Anti-Flagellin L41 1C11, monoklonal	Hauser et al., 1991
Anti-GST, polyklonal (Ziege)	GE Healthcare
für Ligandenaffinitätsblot-Analyse:	
Anti-Faktor H IXF9, monoklonal	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
Anti-Faktor H/FHL-1 B22, monoklonal	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
Anti-FHR-1 JHD 7.10.1, monoklonal	R. Wallich, Universität Heidelberg
Anti-Faktor H human, polyklonal (Ziege)	Calbiochem, Katalog Nr. 341276
Anti-SCR1-4, polyklonal (Kaninchen)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
für Immunfluoreszenztest (IFT):	
Anti-C3, polyklonal (Ziege)	Calbiochem, Katalog Nr. 204869
Anti-C6, polyklonal (Ziege)	Calbiochem, Katalog Nr. 204891
Anti-C5b-9, monoklonal	Quidel, Katalog Nr. A239

2.1.2.2 Konjugierte Sekundär-Antikörper

Antikörper	Herkunft
für Ligandenaffinitätsblot-Analyse:	
Anti-Kaninchen IgG/HRP, polyklonal (Ziege)	Dako, Nr. P0448
Anti-Maus IgG/HRP, polyklonal (Kaninchen)	Dako, Nr. P0260
Anti-Ziege IgG/HRP, polyklonal (Kaninchen)	Dako, Nr. P0449
für Immunfluoreszenztest (IFT):	
Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG (Ziege)	Invitrogen, Nr. A11029
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG (Ziege)	Invitrogen, Nr. A11034
Alexa Fluor 488 F(ab') ₂ Fragment anti-Ziege IgG (Kaninchen)	Invitrogen, Nr. A21222

2.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller, Katalog Nr.
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Nr. 10342-020
Restriktionsendonuklease EcoRI	New England Biolabs, Nr. R0101S
Restriktionsendonuklease BamHI	New England Biolabs, Nr. R0136S
Restriktionsendonuklease XhoI	New England Biolabs, Nr. R0146S
Quick T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Nr. M2200S
Ribonuklease A	Serva, Nr. 34390
Lysozym	Sigma-Aldrich, Nr. 12650-88-3
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Nr. P-2308
Trypsin	Sigma-Aldrich, Nr. T800K

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller, Katalog Nr.
für die DNA-Aufbereitung:	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Nr. 28106
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen, Nr. 28206
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Nr. A1470
für die Transformation von TOP10-Zellen:	
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Nr. K4500-40
für die Ligation von pGEX-6P-1:	
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Nr. M2200S
zur Proteinkonzentrationsbestimmung:	
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Nr. 23227
für den Nachweis von Proteinen auf Membranen:	
Reversible Protein Detection Kit	Sigma-Aldrich, Nr. 017K6825
zur Proteinaufreinigung von GST-Fusionsproteinen:	
GST SpinTrap Purification Module	GE Healthcare, Nr. 27-4570-03
für den Southern Blot:	
ECL direct nucleic acid labelling and detection systems	GE Healthcare, Nr. RPN3001

2.1.5 Proteine

Protein	Herkunft
FHL-1 (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
Faktor H, human (1,12 mg/ml)	Calbiochem, Nr. 341274
SCR1-2 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR1-3 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR1-4 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR1-5 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR1-6 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR6-7 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR8-20 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR15-20 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR19-20 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR15-19 von Faktor H (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
FHR-1 (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR1-2 von FHR-1 (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
SCR3-5 von FHR-1 (Kulturüberstand)	P. F. Zipfel, Leibnitz-Institut, Jena
C3b, human (1 mg/ml)	Calbiochem, Nr. 204860
Faktor I, human (1 mg/ml)	Calbiochem, Nr. 341280

2.1.6 DNA- und Proteinstandards

Marker	Hersteller, Katalog Nr.
123 bp DNA ladder	Invitrogen, Nr. 15613029
Low range PFG Marker	New England Biolabs, Nr. N0350S
Midrange PFG Marker I	New England Biolabs, Nr. N3551S
Precision Plus Protein Standards	BioRad, Nr. 161-0373

2.1.7 Nukleotide für die PCR

Nukleotid	Hersteller, Katalog Nr.
dATP	Roth, Nr. K035.1
dTTP	Roth, Nr. K036.1
dGTP	Roth, Nr. K037.1
dCTP	Roth, Nr. K038.1

2.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Herkunft
BsCRASP-3 145(+) BamHI	GCTGTTTTTGCACGTGTTGGATC CTGTGGAAATTTTAC	Sigma-Aldrich
BsCRASP-3 nc(-)	ATTCATAATTATTCTTCTCGA GTTTGAATTTCTA	Sigma-Aldrich
OspE 34(+)	GCTGTTTTTGCACGTCCCGGGTTC TTGTGGAAAGTTT	Roth
E470 (-)	CTAGTGATATTGCATATTCAG	Sigma-Aldrich
Uhb (+)	GTTGGTTAAAATTACATTTGCG	Sigma-Aldrich
ErpC (+)	ATCATACTTTATATGATGGGC	Sigma-Aldrich
ErpC 3nc(-)	GCTTTTTGATTTCATAATTGTTCT CGAGTATACTTCTAAC	Sigma-Aldrich
ErpA (+)	GCATTTGCAATGGATCCATTTTG GGGAGTTG	Sigma-Aldrich
ErpA (-)	GGCTTTGGATCCAGCAAAAGAT AAAATTACTTCAAG	Sigma-Aldrich
ErpP Hind (-)	CAGCACAAACAATCCAAAGCTT TTTTATTTCATAATTATTC	Sigma-Aldrich
BICRASP-3 55(+) BamHI	GTTTGTCTGATAAGTGGATCCA AACTGATGAAAGC	Sigma-Aldrich
BICRASP-3 3nc(-) Xho	CTTTTTTATTTCATAATTATTCTC GAGTATACTTTAAACTTCTA	Sigma-Aldrich
OspA1	GGGAATAGGTCTAATATTAGC	Sigma-Aldrich
OspA2	CTAGTGTTTTGCCATCTTCTTT	Sigma-Aldrich

2.1.9 Basisvektoren

Vektor	Hersteller, Katalog Nr.
pCR2.1 TOPO	Invitrogen, Nr. K4510-20
pGEX-6P-1 (Expressionsvektor)	GE Healthcare, Nr. 27-4597-01

Die Vektorkarten sind in Abb. 2.1 dargestellt.



Die nachfolgend angegeben Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad verwendet.

31

Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Nr. A951825G
Bisacrylamid	AppliChem, Nr. A1096,0100
Borsäure	Merck, Nr. 1.00165.1000
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Nr. B-5525
BSA-Fraktion V	PAA, Nr. K41-001-100
Calciumchlorid	AppliChem, Nr. A3587,0500
CMRL (10 x konzentriert)	Gibco, Nr. 21540-026
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Nr. D5758
Dimethylformamid	Riedel-de-Haën, Nr. UN2265
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck, Nr. 1.06574.1000
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Nr. D-9163
Dokumol	Tetenal, Nr. 100272
EDTA Dinatriumsalz	AppliChem, Nr. A11D4
EGTA	Sigma-Aldrich, Nr. E-4378
Essigsäure	AppliChem, Nr. KMF.08-209
Ethanol	Riedel-de-Haën, Nr. 32205
Formaldehyd-Lösung (37 %)	Merck, Nr. 1.04003.1000
Gelatine	Merck, Nr. 1.04078.1000
Glucose, D(+)	Roth, Nr. X997.1
Glutaraldehyd-Lösung (25 %)	AppliChem, Nr. A0589,0100
Glycerin	Roth, Nr. 3783.1
Glycin	Roth, Nr. 3908.2
HEPES	Roth, Nr. 9105.2
Hydrogenchlorid (2M)	AppliChem, Nr. A2533,1000
Hydroxylamin	Sigma-Aldrich, Nr. H-9876
IPTG	Roth, Nr. 2316.3
Isopropanol	Merck, Nr. 1.09634.2500
Kaliumchlorid	Riedel-de-Haën, Nr. 31248
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Nr. P-5379
L-Gluthathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Nr. 66529-5G
Lysozym	Sigma-Aldrich, Nr. L-6876
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Nr. 1.05833.0250
Mercaptoethanol	AppliChem, Nr. A1108,0100
Methanol	Riedel-de-Haën, Nr. 32213
Na-5,5-Diethylbarbiturat	Sigma-Aldrich, Nr. B0500
Natriumacetat	AppliChem, Nr. A1522,0250
Natriumacid	Sigma-Aldrich, Nr. S-8032
Natriumbicarbonat	Merck, Nr. 1.06329.0500
Natriumcarbonat	Merck, Nr. 1.06392.1000
Natriumchlorid	Riedel-de-Haën, Nr. 31434
Natriumcitrat	Roth, Nr. 3580.1
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Nr. 6346.0500
Natriumhydroxid	Riedel-de-Haën, Nr. 30620
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Nr. P2256-100G
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Nr. 1.06509.0100
Neopepton	Difco, Nr. 211681
Pefabloc SC (AEBSF)	Merck, Nr. 1.24839.0100
Phenolrot	Merck, Nr. 7241
Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Nr. P-5412
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Nr. P-7626
Protease inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Nr. P 8465

Rinderserumalbumin (35 %-Lösung)	Sigma-Aldrich, Nr. A-7409
Schwefelsäure	Merck, Nr. 1.00731
SDS Laurylsulfat	Sigma-Aldrich, Nr. L-5750
Servablau G	Serva, Nr. 35050
Silbernitrat	AppliChem, Nr. A0536.0025
Superfix Plus	Tetenal, Nr. 102762
TEMED	Roth, Nr. 2367.3
Tricin	AppliChem, Nr. A1085,0500
Tri-Natriumcitratdihydrat	Roth, Nr. 3580.1
Tris	Sigma-Aldrich, Nr. T1503-1KG
Triton X-100	AppliChem, Nr. A1388,0500
Trypton	Bd Biosciences, Nr. 211705
TWEEN20	Roth, Nr. 9127.1
Wasserstoffperoxid (30 %-Lösung)	Roth, Nr. 8070.2
X-Gal	Roth, Nr. 2315.3
Yeast Extrakt	Bd Biosciences, Nr. 212750

2.1.11 Geräte

Pipetten:	Hersteller
Pipetten	Eppendorf/Gilson
Beheizbare Magnetrührer:	
IKAMAG RET	IKA
IKA-COMBIMAG- RCO	IKA
Waagen:	
Analysewaage, 822	Kern
BP110S	Sartorius
pH-Meter:	
pH-Meter, 654	Methrom
Mikroskope:	
Standard 25 mit Dunkelfeldkondensor	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop CX-40	Olympus
Digitalkamera für das Fluoreszenzmikroskop:	
DS-5Mc Digitalkamera	Nikon
Schüttler:	
Rockomat	Integra Biosciences
Schüttler, KL2	E. Bühler
Schüttler, E5	E. Bühler
Vortexer VF2	IKA
Temperierbare Schüttler/Inkubatoren:	
Schüttelwasserbad, 1083	GFL
Thermomixer comfort	Eppendorf
Temperierbarer Schüttler, NOVOTRON	Infors
Zentrifugen und Rotoren:	
Varifuge 3.0R	Heraeus
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman
50Ti Rotor	Beckman

Tischzentrifugen:	
Modell 5402	Eppendorf
Modell 5702R	Eppendorf
Modell 5415D	Eppendorf
Mikro 24-48R	Hettich
Brutschrank:	
Brutschrank	Heraeus
Sterilwerkbank:	
Herasafe HS12	Heraeus
PCR-Thermocycler:	
Progene	Techne
Gene Amp PCR System 2400	Perkin-Elmer
Spektrophotometer/ELISA-Reader:	
Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
PowerWave 200	Bio-Tek Instruments
Ultraschallgerät mit Kühlung:	
Sonifier B-12 mit Becherresonator	Branson/Heinemann
Kühlungsgerät Fryka Multistar	Fryka
Photodokumentationssystem:	
Photodokumentationssystem	Peqlab
Densitometer, GS-710	BioRad
Konzentrator:	
Concentrator 5301	Eppendorf
Agarosegel-Zubehör:	
Netzgerät E443	Consort
Elektrophorese- Kammer, Horizon 11.14	Gibco-BRL
Gel-Kammer, Gel Casting System 11.14	Gibco-BRL
SDS-PAGE und Blotting Zubehör:	
Netzgerät E835	Consort
Semidry Blotter vertikal	LFT
Gelelektrophoresekommer	Sigma-Aldrich
Mikrofiltrationsapparat für Slot Blot	BioRad
GST-Aufreinigung:	
ÄKTAprime	Amersham Biosciences
Intelli – Mixer	LTF
PFGE-Zubehör:	
Elektrophorese-Kammer	BioRad
Kühlmodul	BioRad
Spannungsgeber, CHEF-DR III System	BioRad
Pumpe	BioRad
Für den Southern Blot:	
Vacuum Blotter	Appligene
Fluo Link	Biometra
Hybaid mini oven	MWG-Biotech
Verwendete spezielle Software:	
Microwin Version 3.0	Microtek, Overath
Quantity One 4.0	BioRad
COILS-Programm	Lupas et al., 1991
SOPMA-Programm	Combet et al., 2000
Photoshop Elements 5.0	Adobe
DNASTAR 4.0	DNASTAR Inc.

2.1.12 Spezielle Materialien

2.1.12.1 Normales Humanserum (NHS)

Zur Gewinnung von Humanserum wurde von zehn gesunden Labormitarbeitern Blut abgenommen und die Proben zur Koagulation für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die humanen Blutzellen bei 3500 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und die Gesamtkomplementaktivität im Serum mittels CH50 gemessen, sowie mittels eines IgG- und eines IgM-ELISA das Serum auf spezifische Antikörper gegen Borrelien untersucht. Auf Antikörper negativ getestete Sera mit einer Komplementaktivität im Normbereich (70-200 E.Äq./ml) wurden gepoolt und in Aliquots von 1,5 ml bei -80°C gelagert. NHS wurde direkt vor Verwendung auf Eis aufgetaut.

2.1.12.2 Hitzeinaktiviertes NHS (hiNHS)

NHS wurde aufgetaut und dann für 30 min auf 56°C erhitzt, um eine Komplementinaktivierung der hitzelabilen Komplementfaktoren zu erreichen.

2.1.13 Andere Materialien

Material	Herkunft
Reaktions- und Kulturgefäße:	
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt
Kulturröhrchen 13, 30, 50 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße zur Langzeitlagerung (-80°C)	Nunc
96er Mikrotiterplatte (Rundboden)	Greiner bio-one
96er Mikrotiterplatte (Flachboden)	Costar
Hybridisierungsröhrchen	MWG-Biotech
GST-bindende Mikrotiterplatten:	
Immobilizer Glutathione F96	Nunc
Filterpapiere:	
Chromatographiepapier für Westernblot	Whatman
Filterpapier für Slot Blot	BioRad
Blot-Membranen:	
Nitrozellulosemembran Protran BA85	Whatman
Hybond-N ⁺	GE Healthcare
Zählkammer Hycor	Kova
Sterilfilter:	
Millex - GV PVDF (0,22µm)	Millipore
Chromatographiesäulen:	
GST-Säule GSTrap FF, 1 ml	GE Healthcare
HiTrap Desalting	GE Healthcare
Filter-/Konzentrierungseinheiten:	
Vivaspin 20 ml	Vivascience

Objektträger und Deckgläser:	
Objektträger	knittelGläser, Marienfeld
Deckgläser	Marienfeld
Einschlussmedium:	
Prolong Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen
Filmkassette	Amersham Biosciences
Film:	
Hyperfilm ECL	GE Healthcare

2.1.14 Kulturmedien

2.1.14.1 Modifiziertes Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK-Medium) zur Kultivierung von Borrelien

Grundmedium (1 l)
6 g HEPES
5 g Neopepton
0,7 g Natriumcitrat
5 g D(+)-Glucose
2,2 g Natriumbicarbonat
0,8 g Natriumpyruvat
0,4 g N-Acetylglukosamin
100 ml 10 x CMRL
ad 100 ml Aqua bidest.
pH 7,6 einstellen
sterilfiltrieren (0,22 µm Filter)
Das Grundmedium wurde bei -20°C für maximal 3 Monate gelagert.

Kulturmedium
100 ml Grundmedium (s. o.)
200 ml 7 % Gelatine
72 ml hitzeinaktiviertes Kaninchenserum (56°C für 30 min)
70 ml Rinderserumalbumin (35 %)
Das Kulturmedium wurde in Aliquots von je 10 ml bei 4°C maximal 4 Wochen gelagert.

2.1.14.2 Medien zur Kultivierung von E. coli-Zellen

SOC-Medium	LB-Agar
20 g Trypton	10 g NaCl
5 g Hefeextrakt	10 g Trypton
0,5 g NaCl	5 g Hefe-Extract
10 ml 0,25 M KCl	20 g Agar
5 ml 2 M MgCl ₂	pH 7,0 einstellen
20 ml 1 M Glucose	autoklavieren (20 min, 121°C)
ad 1000 ml Aqua dest.	
pH 7,0 einstellen	
autoklavieren (20 min 121°C)	

2 x YT-Medium	2 x YT zum Einfrieren von <i>E. coli</i>-Zellen
10 g NaCl	500 ml 2 x YT-Medium (s.o.)
10 g Hefe Extrakt	500 ml Glycin
16 g Trypton	
ad 1 l Aqua dest.	
pH 7,5 einstellen	
autoklavieren (20 min, 121°C)	

2.1.15 Lösungen und Puffer für PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.1.15.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tris/Tricin-SDS-PAGE:

Anodenpuffer	Kathodenpuffer	
24,2 g Tris	24,2 g Tris	
ad 2 l	35,8 g Tricin	
pH 8,9 einstellen	10 ml 20 % SDS	
	ad 2 l	
	pH 8,25 einstellen	
Acrylamidlösung	3 x Gelpuffer	4 x Inkubationspuffer
240 g Acrylamid	363,3 g Tris/HCl, pH 8,45	3 g Glycerol
7,5 g Bisacrylamid	15 ml 20 % SDS	6 ml 20 % SDS
ad 500 ml Aqua dest.	ad 1 l Aqua dest.	1,5 ml 1 M Tris/HCl pH 7,0
		8 mg Seablau G
		600 µl Mercaptoethanol
		ad 10 ml Aqua dest.

Zusammensetzung der Tris/Tricin-Gele:

4 % Sammelgel	10 % Trenngel
1 ml Acrylamidlösung	6 ml Acrylamidlösung
3 ml 3 x Gelpuffer	10 ml 3 x Gelpuffer
ad 12 ml Aqua dest.	3 g Glycerol
90 µl 10 % APS	ad 30 ml Aqua dest.
9 µl Temed	150 µl 10 % APS
	15 µl Temed

Glycin-SDS-PAGE (Laemmli-Gele):

5 x Laufpuffer	Acrylamidlösung	4 x Sammelgelpuffer
30 g Tris/HCl, pH 8,3	29,2 g Acrylamid	12,2 g Tris/HCl, pH 6,8
144 g Glycin	0,8 g Bisacrylamid	0,8 g SDS
10 g SDS	ad 100 ml Aqua dest.	ad 200 ml Aqua dest.
ad 2 l Aqua dest.		

4 x Trenngelpuffer	5 x Inkubationspuffer
72,8 g Tris/HCl, pH 8,6	1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 7,0
1,6 g SDS	0,8 ml 10 % Glycerol
ad 400 ml Aqua dest.	0,8 ml 20 % SDS
	0,025 g Bromphenolblau
	ad 7,6 ml Aqua dest.

Zusammensetzung der Laemmli-Gele:

4 % Sammelgel	12,5 % Trenngel
1,3 ml Acrylamidlösung	13,3 ml Acrylamid
2,5 ml Sammelgelpuffer	8 ml Trenngelpuffer
ad 10 ml Aqua dest.	3,2 g Glycerin
50 µl 10 % APS	ad 32 Aqua dest.
10 µl Temed	150 µl 10 % APS
	50 µl Temed

2.1.15.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

kolloidale Servablaulösung	Fixierlösung
0,1 % Servablau (v/v)	45 % Methanol (v/v)
17 % (NH ₄) ₂ SO ₄ (v/v)	1 % Essigsäure (v/v)
0,5 % Essigsäure (v/v)	ad 1 l
34 % Methanol (v/v)	
ad 1 l Aqua dest.	

2.1.15.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Fixierlösung	Inkubationslösung
10 % Essigsäure (v/v)	0,5 g Natriumthiosulfat
40 % Ethanol (v/v)	17 g Natriumacetat
	1,25 ml Glutaraldehyd-Lösung (25 %)
	75 ml Ethanol
	ad 250 ml Aqua dest.

Silberlösung	Entwickler	Stoplösung
625 mg Silbernitrat	6,25 g Natriumcarbonat	29,2 g EDTA
300 µl 37 % Formaldehyd	150 µl Formaldehyd (37 %)	ad 2 l Aqua dest.
ad 250 ml Aqua bidest.	ad 250 ml Aqua bidest.	

2.1.15.4 Westernblot

Westernblot mit Tris/Tricin-Gelen:

Anodenpuffer	Kathodenpuffer
72,66 g Tris, pH 8,7	78,7 g 6-Aminocapronsäure
35,84 g Tricin	7,2 g Tris, pH 8,7
ad 2 l	ad 2 l

Westernblot mit Laemmli-Gelen:

Anodenpuffer I	Anodenpuffer II	Kathodenpuffer
36,3 g Tris, pH 10,4 200 ml Methanol ad 1 l	3,02 g Tris, pH 10,4 200 ml Methanol ad 1 l	5,27 g 6-Aminocaprinsäure 200 ml Methanol ad 1 l pH 7,6 einstellen

2.1.15.5 Ligandenaffinitätsblot-Analyse

TBS	Blockierungspuffer
50 mM Tris/HCl, pH 7,5 200 mM NaCl ad 1 l	0,1 % Tween20 (v/v) in TBS

Waschpuffer	5 x Verdünnungspuffer (Fa. Mikrogen)
0,2 % Tween20 (v/v) in TBS	

2.1.15.6 Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Bindungspuffer	Lysozym-Lösung
140mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3 einstellen	10 mg/ml in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0

Triton X-100-Lösung	Elutionspuffer für GST-Säule
2 % Triton X-100 (v/v) in Aqua dest.	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM reduziertes Glutathion

Elutionspuffer für GST-Säule	Niedrigsalz-Puffer für Entsalzungssäule
50 mM Tris/HCl, 8,0 10 mM red. Glutathion	30 ml 0,2 M Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat 70 ml 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat 8,8 g NaCl ad 1 l Aqua dest. pH 7,0 einstellen

2.1.15.7 ELISA und Kofaktor-Assay

Bindungspuffer	Blockierungspuffer	Waschpuffer
0,05 M Na ₂ CO ₃ 0,02 % NaN ₃ pH 9,6 einstellen	0,1 % (w/v) Gelatine in PBS	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS

Substratpuffer	Substratlösung	Stopplösung
0,1 M KH_2PO_4 pH 6,0 mit KOH einstellen	20 mg O-Phenyldiamin in 20 ml Substratpuffer 20 μl H_2O_2	2,6 M H_2SO_4

2.1.16 Lösungen und Puffer für MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.1.16.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nukleotidtriphosphat-Mix (NTPs)
10 μl 100 mM dATP
10 μl 100 mM dTTP
10 μl 100 mM dGTP
10 μl 100 mM dCTP
ad 500 μl Aqua dest.

2.1.16.2 Agarosegele

5 x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	TE-Puffer
54 g Tris	10 mM Tris/HCl, pH 8,0
27,5 g Borsäure	1 mM EDTA
20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	
ad 1 l Aqua dest.	

Probenpuffer für Agarosegele
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
40 % (w/v) Saccharose

Herstellung der Agarose-Gele:

Eine entsprechende Menge Agarose wurde in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer erhitzt und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Nach Erhärten wurden die Gele bei 4°C gelagert.

2.1.16.3 Southern Blot-Analyse

20 x SSC	Waschpuffer
3 M NaCl	6 M Harnstoff
0,3 M Na_3Citrat	0,4 % (v/v) SDS
pH 7,0 einstellen	0,5 % (v/v) SSC

Hybridisierungspuffer
Gold-Hybridisierungspuffer (ECL Labelling-Kit, GE Healthcare)
0,5 M NaCl
5 % (v/v) Blocking-Agens (ECL Labelling-Kit)

Entwicklerlösung	Fixierlösung
------------------	--------------

150 ml Dokumol	100 ml Superfix
750 ml Aqua dest.	700 ml Aqua dest.

2.1.17 Lösungen und Puffer für SPEZIELLE METHODEN

2.1.17.1 Allgemein verwendete Puffer

VBS-Stammlösung	VBS-Puffer
41,5 g NaCl	20 ml VBS-Stammlösung
5,095 g Na-5,5diethylbarbiturat	100 µl 0,3 M CaCl ₂
17,8 ml 1 M HCl	100 µl 2 M MgCl ₂
ad 1000 ml	0,1 g Gelatine
pH 7,3 einstellen	ad 100 ml
	pH 7,3 einstellen

PBS, 10 x konzentriert
13,64 g Na ₂ HPO ₄
3,18 g NaH ₂ PO ₄
90 g NaCl
ad 1 l
pH 7,4 einstellen

2.1.17.2 Borrelienzelllysate

PBS/MgCl ₂ -Puffer
5 mM MgCl ₂ in PBS

2.1.17.3 Plasmidisolierung aus Borrelien

TES-Puffer
50 mM Tris/HCl, pH 8,0
50 mM EDTA
15 % (w/v) Saccharose

2.1.17.4 Opsonisierungstest

2 x EDTA	2 x EGTA
20 ml 0,2 M EDTA, pH 7,5	10 ml 0,1 M EGTA, pH 7,5
16 ml VBS	20 ml VBS
ad 100 ml Aqua dest.	ad 100 ml Aqua dest.

Hydroxylamin-Lösung:	PBS-NaCl-Lösung:
700 mg Hydroxylamin	100 ml PBS
5 ml 0,4 M Na ₂ CO ₃	2,02 g NaCl
pH 10,5 einstellen	
ad 10 ml Aqua dest.	

2.1.17.5 Serumadsorptionstest

EDTA-Lösung	Glycin-Lösung	Tris/HCl-Lösung
1 M EDTA, pH 8,0	0,1 M Glycin, pH 2,0	1 M Tris/HCl, pH 9,0

10 x Phosphatpuffer nach Sørensen (Stammlösung)
Lösung A: 0,2 M Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ad 1 l
Lösung B: 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat ad 1 l

PBSA
150 mM NaCl
30 mM Phosphatpuffer, pH 7,2
0,02 % (w/v) NaN ₃

2.2 Methoden

2.2.1 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.1.1 *Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Zur Herstellung der SDS-Gele wurde zunächst ein Trenngel (10 % bei Tris/Tricin-Gelen; 12,5 % bei Laemmli-Gelen) gegossen. Nach Auspolymerisierung wurde das Trenngel mit dem 4 % Sammelgel überschichtet und der entsprechende Kamm eingesetzt. Fertige Polyacrylamidgele wurden entweder direkt verwendet oder bis zu 14 Tage bei 4°C gelagert.

Für Tris/Tricin-SDS-Gele wurden 10 µl Proteinstandard mit 10 µl Aqua dest. und 6,8 µl Inkubationspuffer versetzt und 30 min bei 40°C inkubiert. Für Laemmli-SDS-Gele wurden 10 µl des Proteinstandards direkt verwendet.

Die, wie in den Kapiteln der jeweiligen Methode beschrieben, vorbereiteten Proteinproben wurden auf das SDS-Gel aufgetragen und zunächst für 1 h bei 40 V im Sammelgel aufgetrennt und anschließend entweder 12 h bei 75 V (Zelllysate, gereinigte Proteine, Proben aus der Serumadsorption) oder 4 h bei 200 V (Proben aus dem Opsonisierungstest und Kofaktor-Assay) im Trenngel separiert.

2.2.1.2 *Westernblot*

In einer Semidry-Blotkammer wurden luftblasenfrei in Anodenpuffer getränktes Filterpapier, die im gleichen Puffer getränkte Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und letztendlich in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier geschichtet.

Hierbei wurden bei Tris/Tricin-Gelen jeweils vier Lagen Filterpapier verwendet, bei Laemmli-SDS-Gelen dagegen zunächst drei Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer I, dann sechs Lagen mit Anodenpuffer II und neun Lagen mit Kathodenpuffer verwendet. Die Proteine wurden über 2 h bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² transferiert.

2.2.1.3 *Westernblot-Analyse*

Zunächst wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver in Blockierungspuffer (TBS-0,1 % Tween20) 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert und dann 4 mal je 8 min mit Blockierungspuffer gewaschen.

Zur Identifizierung von Proteinen wurde die Membran mit einem entsprechenden Primärantikörper und nachfolgend mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert.

Zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten wurde die Membran 4 mal je 8 min mit Waschpuffer (TBS-0,2 % Tween20) gewaschen um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend durch Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) sichtbar gemacht.

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
GST	Anti-GST (1:2000)	Anti-Ziege IgG/HRP (1:1000)
Flagellin	Anti-Flagellin LA41 1C11 (1:100)	Anti-Maus IgG/HRP (1:1000)

Die Verdünnung aller Antikörper erfolgte in Waschpuffer (Fa. Mikrogen).

Tab. 2.1, Für die Westernblot-Analyse verwendete Antikörper

2.2.1.4 Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Zum Nachweis von Faktor H respektive FHL-1 bindenden Proteinen wurde die Membran zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver in Blockierungspuffer (TBS-0,1 % Tween20) 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert und dann vier mal je 8 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h schaukelnd bei Zimmertemperatur mit dem entsprechenden Liganden beladen. Als Quelle für Faktor H diente NHS. FHL-1 wurde als Kulturüberstand verwendet. Nach dem Inkubationsschritt wurde die Membran viermal je 8 min mit Waschpuffer (TBS-0,2 % Tween20) gewaschen.

Der Nachweis von bindenden Komplementproteinen erfolgte mit teils spezifischen Primär- und anschließend entsprechenden Sekundärantikörpern und TMB, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben.

Ligand	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Faktor H aus NHS	IXF9, monoklonal (unverdünnt), oder Anti-Faktor H, polyklonal (1:1000)	Anti-Maus IgG/HRP Anti-Ziege IgG/HRP
FHL-1	Anti-SCR1-4 (1:1000), oder B22, monoklonal (1:1000)	Anti-Kaninchen IgG/HRP Anti-Maus IgG/HRP
FHR-1	JHD 7.10.1, monoklonal (unverdünnt)	Anti-Maus IgG/HRP

Die Verdünnung aller Antikörper erfolgte in Verdünnungspuffer (Fa. Mikrogen), alle Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Tab. 2.2, Für die Ligandenaffinitätsblot-Analyse verwendete Antikörper

Zur Identifizierung der Bindungsdomäne von Faktor H, FHL-1, FHR-1 und Faktor H-Fragmenten an BICRASP-3 wurde eine Ligandenaffinitätsblotanalyse mit gereinigtem BICRASP-3 als GST-Fusionsprotein durchgeführt. Das Schema der verwendeten Liganden und Antikörper ist Tab. 2.3 zu entnehmen. Zunächst wurde die Membran zur Blockierung

unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver in Blockierungspuffer (TBS-0,1 % Tween20) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann 4 mal je 8 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h schaukelnd bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Liganden inkubiert und dann 4 mal je 8 min mit Waschpuffer (TBS-0,2 % Tween20) gewaschen. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primärantikörper und nachfolgend mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper. Zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten wurde die Membran 4 mal je 8 min mit Waschpuffer (TBS-0,2 % Tween20) gespült um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend durch Zugabe von TMB sichtbar gemacht.

Ligand	Primärantikörper	Sekundärantikörper
SCR1-2	Anti-SCR1-4	Anti-Kaninchen IgG/HRP
SCR1-3	Anti-SCR1-4	Anti-Kaninchen IgG/HRP
SCR1-4	Anti-SCR1-4	Anti-Kaninchen IgG/HRP
SCR1-5	Anti-SCR1-4	Anti-Kaninchen IgG/HRP
SCR1-6	Anti-SCR1-4	Anti-Kaninchen IgG/HRP
FHL-1	Anti-SCR1-4	Anti-Kaninchen IgG/HRP
SCR6-7	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
NHS	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
SCR8-20	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
SCR15-20	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
SCR19-20	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
SCR15-19	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
FHR-1	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
SCR1-2 v. FHR-1	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
SCR3-5 v. FHR-1	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
-	Anti-SCR1-4	Anti-Kaninchen IgG/HRP
-	Anti-Faktor H, polyklonal	Anti-Ziege IgG/HRP
-	Anti-GST (1:2000)	Anti-Ziege IgG/HRP

Die Verdünnung aller Antikörper erfolgte, soweit nicht anders angegeben, 1:1000 in Verdünnungspuffer.

Tab. 2.3, Für die Lokalisierung der Bindungsdomäne von Faktor H, FHL-1, FHR-1 und Faktor H-Fragmenten an BICRASP-3 verwendete Liganden und Antikörper

2.2.1.5 Kolloidale Coomassie-Färbung

Das zu färbende SDS-Gel wurde für 3 h in Fixierlösung (s. Material, Kapitel 2.1.15.2) und dann mindestens 4 h in Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 3 h unter leichtem Schütteln mit Aqua bidest. entfärbt.

2.2.1.6 Silberfärbung von SDS-Gelen

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel zunächst 30 min in Fixierlösung (s. Material, Kapitel 2.1.15.3) inkubiert und anschließend 30 min in Inkubationslösung geschüttelt. Dann wurde das Gel 3 mal für je 5 min mit Aqua bidest. gewaschen und anschließend 20 min in Silberlösung geschwenkt. Nach zweimaligem Spülen mit Aqua bidest. wurden die Proteine durch kurzes Schütteln in Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde durch 10minütiges Schwenken in Stopplösung beendet.

2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von gereinigten Proteinen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (s. Material, Kapitel 2.1.4) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.8 Überexpression von Proteinen im kleinen Versuchsmaßstab

Für die Überexpression von Proteinen wurden *E. coli* JM109-Zellen, die den Expressionsvektor pGEX-6P-1 mit dem entsprechenden Borreliegenen enthielten, verwendet. Dieser Vektor besitzt die Eigenschaft, dass während der Induktion ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag) hergestellt wird.

Ausgehend von einer Übernachtskultur (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.3) wurden 500 µl zum Animpfen von 20 ml 2 x YT Medium, supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml), verwendet und diese Kultur bei 37°C und 200 rpm schüttelnd inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte. Hierauf erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 4 µl einer 0,5 M IPTG-Stammlösung und einer weiteren Inkubation bei 21°C für 3 h. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 x g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment in 500 µl Bindungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl 1 M DTT wurden die Zellen 5 mal 15 s mit 45 s Pause bei 4°C sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 10 000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

2.2.1.9 Überexpression von Proteinen im großen Versuchsmaßstab

Selektivmedium (500 ml 2 x YT-Medium, supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml)), wurde mit einer ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt und wie folgt weiterbehandelt:

Die Kultur wurde bei 37°C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 100 µl einer 0,5 M IPTG-Stammlösung. Nach Inkubation für 4 h bei 21°C wurden die Zellen in Aliquots von je 50 ml

bei 5000 x g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das Zellsediment über Nacht bei -70°C eingefroren.

Am nächsten Tag wurden die Sedimente auf Eis aufgetaut, jeweils in 2,4 ml Bindungspuffer resuspendiert. Jeweils zwei Röhrchen wurden auf ein Endvolumen von 4,8 ml vereinigt, mit 100 µl Lysozym-Lösung versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Bakterien in zwei Zyklen sonifiziert (je 6 mal 30 s mit 45 s Pause bei 4°C), zwischen den zwei Ultraschallszyklen wurde jedem Röhrchen 50 µl 2 %ige Triton X-100-Lösung zugesetzt. Anschließend wurden die Röhrchen für 1 h auf Eis schüttelnd inkubiert und die Zellreste dann bei 16 000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 0,22 µm Rundfilter filtriert und in Aliquots von je 5 ml bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

2.2.1.10 Chromatographische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Vor der Aufreinigung wurden die Überstände (s. Methoden, Kapitel 2.2.1.8 und 2.2.1.9) auf Eis aufgetaut.

Rekombinante GST-Fusionsproteine aus der Überexpression im kleinen Versuchsmaßstab wurden mit dem GST SpinTrap Purification Module nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Zur Aufreinigung größerer Mengen an rekombinantem Protein aus der Überexpression im großen Versuchsmaßstab wurde eine 1 ml GSTrap FF-Säule in Kombination mit der ÄKTAprime verwendet. Hierbei kam das vom Hersteller vorinstallierte Programm für die Aufreinigung von fusionierten GST-Proteinen zum Einsatz. Dieses beinhaltete als ersten Schritt das Äquilibrieren der Säule mit Bindungspuffer mit nachfolgender Applikation des proteinhaltigen Zelllysates. Im Folgenden wurden nicht gebundene Proteine mit Bindungspuffer von der Säule gewaschen und zuletzt mit Elutionspuffer das GST-Fusionsprotein eluiert. Die Fraktionen, welche das gewünschte Protein enthielten wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit Vivaspin-Säulen (cut off 5000 MW) durch Zentrifugieren bei 3500 x g und 4°C auf 1 ml aufkonzentriert.

Anschließend wurden die gereinigten Proteine über eine Säule (HiTrap Desalting) entsalzt und ein weiteres Mal durch Ultrafiltration mit Vivaspin-Säulen auf 1 ml aufkonzentriert.

2.2.1.11 Protease-Assay

Borrelienzellen aus Kultur wurden bei 5000 x g 30 min und 4°C abzentrifugiert, zweifach mit 400 µl PBS gewaschen und die Zellen nach Sedimentieren bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C

in 500 µl PBS resuspendiert. Die Zelldichte wurde ermittelt und 10 Ansätze mit jeweils 4×10^8 Zellen nach dem in Tab. 2.4 dargestellten Schema pipettiert und für 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert:

Ansatz	Proteinase K-Lsg. (0,5 mg/ml)	Trypsin-Lsg. (0,5 mg/ml)	PBS
1	-	-	ad 500 µl
2	2,5 µl	-	ad 500 µl
3	5 µl	-	ad 500 µl
4	10 µl	-	ad 500 µl
5	20 µl	-	ad 500 µl
6	-	-	ad 500 µl
7	-	2,5 µl	ad 500 µl
8	-	5 µl	ad 500 µl
9	-	10 µl	ad 500 µl
10	-	20 µl	ad 500 µl

Tab. 2.4, Pipettierschema des Protease-Assay

Nach der Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 5 µl AEBSF (100 mg/ml) und 5 µl PMSF (50 mg/ml) (Ansätze 1 bis 5), bzw. 5 µl AEBSF (100 mg/ml), 5 µl PMSF (50 mg/ml) und 5 µl Pefabloc SC (100mg/ml) (Ansätze 6 bis 10) abgestoppt.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben abzentrifugiert, zweifach mit je 500 µl PBS/MgCl₂ gewaschen und anschließend 5 mal 30 s mit jeweils 30 s Pause auf Eis sonifiziert.

Für die SDS-PAGE wurden 2 µl des Sonikats mit 8 µl Aqua dest. und 3,5 µl Tris/Tricin-Inkubationspuffer versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte mittels 10 % Tris/Tricin-SDS-PAGE.

2.2.1.12 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für den ELISA wurde eine mit Glutathion beschichtete Mikrotiterplatte verwendet. Der Aufbau des Tests ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt. Gereinigtes GST-Fusionsprotein (5 ng/µl) wurde in 200 µl Bindungspuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wurde 3 mal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit je 200 µl Blockierungspuffer für 6 h bei Zimmertemperatur geblockt. Die Inkubation mit Faktor H (0,5 ng/µl) in Waschpuffer erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde wiederum 3 mal gewaschen und polyklonaler anti-Faktor H-Antikörper (Verdünnung 1:1000 in PBS) hinzugegeben. Nach 6 h Inkubation bei Zimmertemperatur wurde wiederholt gewaschen und anschließend ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000 in PBS) hinzu pipettiert. Die Detektion erfolgte nach Waschen der Platte mit 100 µl Substratlösung. Nach ca. 5 min wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung terminiert. Die Messung im ELISA-Reader erfolgte bei 490 gegen 560 nm.

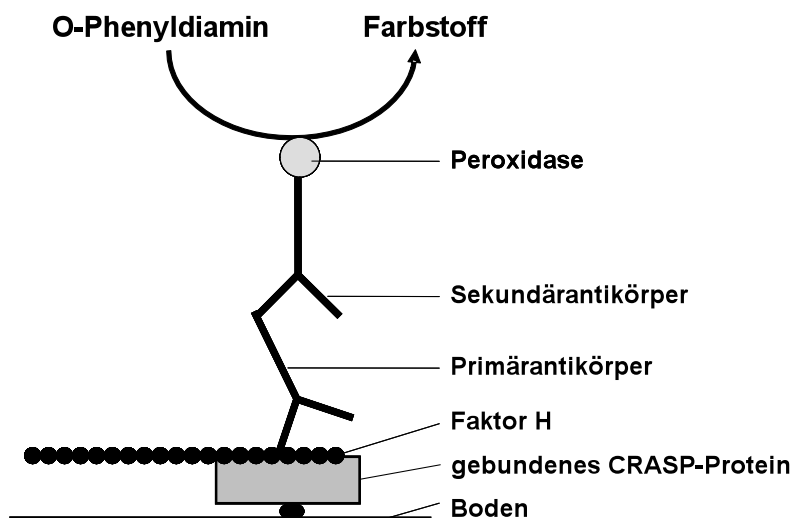


Abb. 2.2, schematische Darstellung des ELISA

2.2.1.13 Kofaktor-Assay mit gereinigtem GST-Fusionsprotein

Für den Kofaktor-Assay wurde eine mit Glutathion beschichtete Mikrotiterplatte mit dem in Bindungspuffer gelösten GST-Fusionsprotein beladen. Hierfür wurden 500 ng gereinigtes Protein in 100 µl Bindungspuffer verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden 3 mal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen und die Mikrotiterplatte mit 200 µl Blockierungspuffer für 6 h geblockt. Anschließend wurden pro Ansatz 500 ng Faktor H in 100 µl Waschpuffer zugegeben, 6 h bei Raumtemperatur inkubiert und überschüssiges Faktor H-Protein durch dreimaliges Waschen entfernt. Danach wurden 50 µl einer Lösung bestehend aus Faktor I (1:50) und C3b (1:100) in PBS hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle aus 50 µl Faktor I/C3b-Lösung mit 500 ng Faktor H und eine Negativkontrolle ohne Faktor H mitgeführt.

Die Reaktionsüberstände wurden mit 13,5 µl Inkubationspuffer mit Mercaptoethanol (1:20) versetzt, bei 95°C für 5 min inkubiert und davon 20 µl in einem 12,5 % Laemmli-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Gene von *B. lusitaniae* wurde die PCR als Methode der Wahl eingesetzt. Hierbei wurde im ersten Schritt die doppelsträngige Borrelien-DNA bei einer Temperatur von 94°C denaturiert, dann erfolgte die Anlagerung der Primer (Annealing) bei

50°C und im dritten Schritt die Elongation bei 72°C. Die für diese Arbeit verwendete Taq DNA-Polymerase besaß zusätzlich die Eigenschaft, an den neu synthetisierten DNA-Strang ein zusätzliches Adenosin anzuhängen.

Für einen Reaktionsansatz von 100 µl wurde die folgende Zusammensetzung verwendet:

10 µl	10 x Polymerase-Puffer
5 µl	MgCl ₂
10 µl	NTPs
1 µl	Primer 1
1 µl	Primer 2
0,5 µl	Taq DNA-Polymerase
X µl	Borrelia-lysate
<u>72,5 – X µl</u>	Aqua dest.
100 µl	

Als DNA-Template dienten 2 µl Borrelia-lysate. Hierfür wurden Borrelia aus Kultur bei 5000 x g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit 1 ml PBS gewaschen, bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert und das Pellet in 100 µl Aqua dest. resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen wurden diese für 5 min bei 95°C gekocht. Die Zellreste wurden wie oben beschrieben abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

Für die Amplifikation der Erp-kodierenden Gene wurden folgende Einstellungen für Zeiten und Temperaturen gewählt:

Dauer	Temperatur	Schritt	Wiederholungen
5 min	95°C	Initiale Denaturierung	1 x
1 min	94°C	Denaturierung	30 x
1 min	50°C	Annealing	
40 s	72°C	Elongation	
7 min	72°C	Abschließende Elongation	1 x

Der Reaktionsansatz wurde sofern nicht sofort weiterverwendet, bei 4°C gelagert.

Für die Amplifikation des OspA kodierenden Gens wurde das Programm folgendermaßen modifiziert:

Dauer	Temperatur	Schritt	Wiederholungen
4 min	94°C	Initiale Denaturierung	1 x
1 min	94°C	Denaturierung	30 x
1 min	55°C	Annealing	
1 min	72°C	Elongation	
9 min	72°C	Abschließende Elongation	1 x

Bei jeder PCR wurde eine Reaktion ohne Zugabe von DNA als Negativkontrolle mitgeführt.

2.2.2.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die **Transformation von *E. coli* Top10-Zellen** wurde das TOPO TA Cloning Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Vor der Ligation wurde die entsprechende PCR-Reaktion mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit von Primern und Protein gereinigt und das Amplifikat gleichzeitig aufkonzentriert. Für die Ligation des amplifizierten Gens in den Vektor wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet:

4 µl	Gereinigtes Amplifikat aus PCR-Reaktion
1 µl	Salzlösung
1 µl	Vektor pCR2.1 TOPO
<hr/>	
6 µl	

Der Ligationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, wobei sich das Amplifikat mit dem überhängenden Adenosin an ein überhängendes Thymidin des Vektors anlagert und so in den Vektor eingebaut wird.

2 µl des Ligationsansatzes wurden in ein Reaktionsgefäß mit auf Eis aufgetauten Top10-Zellen pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Für die Transformation wurden die Zellen 30 s bei 42°C hitzegeschockt, mit 250 µl SOC-Medium versetzt und anschließend für 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden nun auf LB-Selektivnährböden, supplementiert mit 20 µl Ampicillin-Lösung (50 mg/ml) und 20 µl X-Gal-Lösung (50 mg/ml), ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet. Weiße Klone wurden am folgenden Tag abgeimpft und in Flüssigkultur mit 2 x YT-Medium, supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml), propagiert.

Für die **Transformation von *E. coli* JM109-Zellen** wurde der Expressionsvektor pGEX-6P-1 verwendet, welcher bereits als BamHI und XhoI restringierter Vektor vorlag. Entsprechend wurde auch das amplifizierte Gen, welches kloniert werden sollte, zunächst mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.5).

Die Ligation erfolgte mit dem Quick Ligation Kit mit folgender Zusammensetzung des Ligationsansatzes:

3 µl	mit Restriktionsenzymen behandeltes Amplifikat
5 µl	Vektor pGEX-6P-1 (50 ng/µl)
10 µl	10 x Quick Ligasepuffer
1 µl	Quick T4 DNA-Ligase
1 µl	Aqua dest.
<hr/>	
20 µl	

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und bei 25°C über Nacht inkubiert.

Die kompetenten JM109 Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 100 µl davon mit 5 µl des Ligationsansatzes versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Zellen bei 42°C für 30 s hitzegeschockt. Es wurden 250 µl 2 x YT-Medium hinzugegeben und die Suspension bei 37°C für 2 h leicht schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden auf Selektiv-LB-Agarplatten, supplementiert mit 20 µl Ampicillin-Lösung (50 mg/ml), ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag selektioniert und in je 5 ml 2 x YT-Medium, supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml), vermehrt.

2.2.2.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte aus Übernachtskulturen mit dem SV Miniprep-Kit nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten DNA wurde in einer Verdünnung von 1:10 in Aqua dest. photometrisch (Ultrospec 3100 pro) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und daraus die DNA-Konzentration berechnet. Die Reinheit der isolierten DNA wurde durch Bestimmung des Quotienten der Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm ermittelt.

2.2.2.5 Restriktionsanalyse

Die Restriktion von Amplifikaten **mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI** wurde wie folgt durchgeführt, wobei PCR-Amplifikat zunächst mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Primern gereinigt wurde:

50 µl	gereinigtes Amplifikat
10 µl	10 x NEBuffer 3
1 µl	100 x BSA
4 µl	BamHI (80 U)
4 µl	XhoI (80 U)
31 µl	Aqua dest.
<hr/>	
100 µl	

Für die Restriktion von Plasmiden **mit dem Restriktionsenzym EcoRI** wurde der folgende Ansatz verwendet:

250 ng	gereinigtes Plasmid
1 µl	10 x NEBuffer für EcoRI
0,5 µl	EcoRI (10 U)
Ad 10 µl	Aqua dest.

Die Restriktionsansätze wurden bei 37°C schüttelnd über Nacht inkubiert.

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden zunächst mit Probenpuffer (1:5) versetzt und dann auf ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE. Nach erfolgter Gelelektrophorese bei 180 V für 1-2 h wurde die DNA 10 - 30 min mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt, das Gel kurz mit Wasser gespült und die DNA-Fragmente auf dem UV-Transilluminator visualisiert.

2.2.2.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese lassen sich große DNA-Fragmente (>20 kb) besser auftrennen, als mit der herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese.

Für die PFGE wurden grundsätzlich 1 %ige Agarosegele verwendet. Je 200 ng isolierte Borrelien-DNA wurden mit 3 µl Probenpuffer versetzt und auf das Gel appliziert. Für die Pulsfeldgelelektrophorese wurde eine Spannung von 6 Volt/cm² unter einem Winkel von 120° angelegt und die DNA über 24 h aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.2.8 Southern Blot-Analyse

Für die Southern Blot-Analyse, wurde die mittels PFGE aufgetrennte DNA zunächst wie folgt behandelt. Das Gel wurde nacheinander für 10 min mit 0,15 M HCl depurinisiert, für 30 min

mit 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert und für 60 min mit 0,5 M Tris/3 M NaCl neutralisiert. Dazwischen erfolgte jeweils ein Waschschrift mit Aqua dest.

Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺) erfolgte mittels Vakuumtransfer. Dazu wurde das vorbehandelte Gel auf ein mit 20 x SSC getränktes Filterpapier und der angefeuchteten Membran positioniert. Anschließend wurde das Gel mit 20 x SSC überschichtet und für 2 h ein Vakuum von 46 mbar erzeugt um die DNA-Fragmente auf die Membran zu transferieren. Die Nylonmembran wurde anschließend mit 2 x SSC gewaschen und dann die DNA-Fragmente durch UV-Einwirkung unter 0,12 J/cm² kovalent an die Membran gebunden.

Zur Herstellung der Hybridisierungssonde und für die anschließende Detektion wurde das ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems - Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Herstellung der Hybridisierungssonde erfolgte mittels PCR des entsprechenden Genabschnitts. Die PCR-Reaktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und der Reaktionsansatz dann mit dem Purification-Kit gereinigt.

Für die Markierung wurde das PCR-Amplifikat auf eine Konzentration von 10 ng/μl verdünnt und 100 ng der DNA für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Das gleiche Volumen Markierungsreagenz wurde zugegeben, gemischt und anschließend ein äquivalentes Volumen Glutaraldehydlösung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37°C inkubiert und ohne zeitliche Verzögerung weiterverwendet.

Die Nylonmembran wurde vor Zugabe der Hybridisierungssonde in 5 x SSC angefeuchtet und dann mit 0,125 ml/cm² Hybridisierungspuffer für 15 min vorinkubiert. Die Hybridisierungssonde wurde zugegeben und mit der Membran über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran mit Waschpuffer einmal 20 min und zweimal je 10 min gewaschen und dann zweimal je 5 min in 2 x SSC gespült.

Für die Detektion wurde die Membran mit 0,125 ml/cm² Detektionsreagenz, bestehend aus gleichen Teilen Detektionslösung A und B, überschichtet und 1 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Überschüssiges Detektionsreagenz wurde entfernt und die Membran zusammen mit einem ECL-Film in einer Filmkassette platziert. Die Filme wurden für 1 min, 5 min und über Nacht belichtet und dann 5 min in Entwicklerlösung entwickelt, mit Aqua dest. gespült und abschließend 5 min in Fixierlösung getaucht.

2.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von gereinigten Plasmiden erfolgte durch die Firma GATC.

2.2.3 SPEZIELLE METHODEN

2.2.3.1 *In vitro*-Kultivierung von *Borrelia*

Borrelia wurden in modifiziertem Barbour-Stoenner-Kelly-Medium unter mikroaerophilen Bedingungen bei 33°C kultiviert. Hierbei wurden Zellkonzentrationen von ca. 10^6 - 10^8 /ml erreicht. Alle drei bis sieben Tage, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Spirochäten, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen 1-3 ml Kultur in frisches BSK-Medium überimpft. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Kontrolle auf Kontamination anhand Dunkelfeldmikroskopie.

Um das Risiko für den Verlust von Plasmiden zu vermindern, wurden niedrige Passagen der *Borrelia* in Aliquots von 1,8 ml bei -80°C eingefroren. Für die Untersuchungen wurden möglichst niedrig passagierte *Borrelia*-Stämme verwendet. Bei Bedarf wurden die Kryokulturen in frischem Medium angeimpft.

2.2.3.2 *In vitro*-Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder auf LB-Agar als Festnährboden oder als Flüssigkultur in 2 x YT-Medium angezüchtet. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C über Nacht, wobei Flüssigkulturen bei 200 rpm geschüttelt wurden.

Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme wurden entweder auf LB-Selektivagar, supplementiert mit 20 µl Ampicillin-Lösung (50 mg/ml), oder in 2 x YT-Medium, supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml), gezüchtet.

Die Lagerung der *E. coli*-Stämme erfolgte entweder bei 4°C für bis zu 14 Tage, oder längerfristig nach Zugabe von 2 x YT/Glycerin-Lösung mit einer Glycerin-Endkonzentration von 1:4 bei -80°C.

2.2.3.3 Herstellung von Übernachtskulturen

Zur Herstellung einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden 10 ml 2 x YT Medium, supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml) versetzt und anschließend mit 20 µl der entsprechenden *E. coli*-Kultur beimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 200 rpm.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Borrelien im Dunkelfeldmikroskop

Zur Bestimmung der Konzentration von Borrelien einer Kultur wurde ein Aliquot bei 5000 x g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert, die Zellen in 500 µl PBS-Puffer aufgenommen und in mehreren Verdünnungsstufen in PBS verdünnt. Anschließend wurden die Borrelien in einer standardisierten Hycor-Zählkammer (Kova) im Dunkelfeldmikroskop gezählt und hieraus die Konzentration der Bakterienzellen anhand der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Zelldichte [Zellen/}\mu\text{l]} = [\sum_{\text{gezählte Zellen}} / \text{Anzahl gezählter Felder}] \times K \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

K: Kammerfaktor 90

2.2.3.5 Bestimmung der Zelldichte einer *E. coli*-Kultur

Die Dichte einer mit *E. coli*-Zellen bewachsenen Flüssigkultur wurde photometrisch bestimmt. Hierbei erfolgte die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Verhältnis zu unbewachsenem 2 x YT-Medium (Referenz).

2.2.3.6 Herstellung eines Zelllysates von Borrelien mit Ultraschall

Borrelienzellen aus Kultur wurden 30 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert und 4 mal mit 400 µl PBS/MgCl-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 50-200 µl PBS/MgCl₂ resuspendiert und im Becherresonator bei 4°C 5 mal 30 s mit jeweils 30 s Pause sonifiziert. Die Zelllysate wurden anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3.7 Herstellung eines Zelllysates von *E. coli* mit Ultraschall

E. coli-Zellen aus Kultur wurden für 30 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert und 4 mal mit 400 µl PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert und im Becherresonator bei 4°C 5 mal 30 s mit jeweils 30 s Pause sonifiziert. Die Zelllysate wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Zelllysate auf Eis aufgetaut, 30 min bei 40°C mit Tris/Tricin-Inkubationspuffer inkubiert und auf ein Tris/Tricin-Gel aufgetragen.

2.2.3.8 Plasmidisolierung aus Borrelien

Borrelien aus der lag-Phase wurden bei 5000 x g für 30 min bei 4°C sedimentiert, mit 500 µl TES-Puffer gewaschen und in 240 µl TES resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend

durch Zugabe von 2,4 µl Lysozymlösung (50 mg/ml) lysiert. Nach Inkubation auf Eis für 15 min wurden 300 µl einer Lösung aus 1 % SDS in TES-Puffer und 7 µl DEPC hinzugegeben, um aus den Zellen freigesetzte proteolytische Enzyme zu inaktivieren. Die Reaktion wurde für 10 min kräftig geschüttelt. Zur Präzipitation der Proteine wurden 250 µl 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung hinzugegeben und die Zellreste bei 12 000 x g für 10 min bei Zimmertemperatur abzentrifugiert. Nukleinsäuren im Überstand wurden durch Zugabe von 850 µl Isopropanol für 30 min bei -20°C präzipitiert. Das Sediment wurde durch Zentrifugation bei 14 000 x g für 30 min bei 4°C gewonnen und dieses mit 500 µl 70 % Ethanol versetzt. Die DNA wurde bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und im Konzentrator vollständig getrocknet. Die DNA wurde in 300 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend mit 3 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl DEPC inhibiert. Nun wurden 150 µl 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung hinzugegeben und erneut abzentrifugiert (11 000 x g, 5 min, Zimmertemperatur). Der Überstand wurde mit 1,3 ml 100 % eiskaltem Ethanol versetzt und für 20 min bei -20°C gelagert. Das Sediment wurde durch Zentrifugation bei 14 000 x g und 4°C für 30 min gewonnen, mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 14000 x g und 4°C abzentrifugiert. Die DNA wurde getrocknet und abschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.3.9 Colorimetrischer Bakterizidie Assay (CBA)

Die Borrelien aus Kultur wurden 30 min bei 5000 x g und 4°C sedimentiert, in BSK-Medium aufgenommen und gezählt (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.4).

Unter sterilen Bedingungen wurden in einer Mikrotiterplatte $1,25 \times 10^7$ Borrelien in 50 µl BSK-Medium, 50 µl Phenolrot in BSK-Medium (im Verhältnis 5:1) und 100 µl NHS gemischt, so dass sich ein Ansatz mit 50 % Serum ergab. Anschließend wurde die Platte verschlossen und mit Parafilm versehen und bei 33°C inkubiert. Sofort (0 h), 3 h und anschließend alle 24 h wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen photometrisch die Extinktion bei 562/630 nm bestimmt. Durch Ansäuerung des Mediums durch stoffwechselaktive Borrelien sinkt der pH-Wert, es erfolgt ein Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb und die Extinktionswerte nehmen ab. Am letzten Versuchstag wurden die Platten geöffnet und mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Kontamination überprüft.

Jeder Test erfolgte in vierfacher Ausführung. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte und die entsprechende Standardabweichung ab dem Messpunkt nach 3 h berechnet.

Zusätzlich wurden Ansätze mit Borrelien in 50 % hitzeinaktiviertem NHS (hiNHS) als Positivkontrolle und mit Borrelien in Medium ohne NHS als Wachstumskontrolle durchgeführt.

2.2.3.10 Immunfluoreszenztest (IFT)

Borrelienzellen aus Kultur wurden 30 min bei 5000 x g und 4°C sedimentiert und mit 500 µl VBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien gezählt (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.4), 6×10^6 Zellen in 75 µl VBS wurden mit 25 µl NHS versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und zwei mal mit PBS 0,2 % BSA gewaschen um überschüssiges Serum zu entfernen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS 0,2 % BSA resuspendiert und davon je 10 µl auf einen vorher mit Aceton, Ethanol und destilliertem Wasser gereinigten Glasobjektträger pipettiert. Nach dem Trocknen über Nacht wurden die Zellen für 10 min auf dem Objektträger mit Methanol fixiert.

Die Objektträger wurden zunächst mit einem Primärantikörper gegen die Komplementkomponenten C3 (1:1000), C6 (1:200) bzw. C5b-9 (TCC, 1:50), jeweils verdünnt in PBS 0,2 % BSA und dann mit einem Alexa 488-konjugierten Sekundärantikörper (1:2000) jeweils 1 h bei 33°C in der feuchten Kammer inkubiert. Dazwischen und danach erfolgten je 4 Waschschrte für 5 min mit PBS. Abschließend wurden die Objektträger mit einem DAPI-haltigen Einschlussmedium und einem Deckgläschen eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit hiNHS inkubiert und unter sonst gleichen Bedingungen wie oben beschrieben, behandelt.

2.2.3.11 Serumadsorptionstest

Borrelien aus einer gut bewachsenen Kultur wurden bei 5000 x g für 30 min bei 4°C sedimentiert, mit 1 ml VBS-Puffer gewaschen, in 500 µl VBS resuspendiert und gezählt (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.4). 1×10^9 Borrelien wurden bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment in 750 µl NHS-EDTA (724,5 µl NHS, welches zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 min mit 25,5 µl EDTA inkubiert wurde) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei Zimmertemperatur wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert und 3 mal mit 500 µl PBSA/ 0,05 % Tween20 gewaschen um unspezifisch gebundene Serumbestandteile zu entfernen. Der letzte Waschschrte erfolgte mit

60 µl PBSA/ 0,05 % Tween20. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert.

Die an die Borrelienoberfläche gebundenen Serumproteine wurden mit 60 µl 0,1 M Glycin-Lösung (pH 2) eluiert und die Zellen anschließend 15 min bei 14 000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde mit 4,8 µl Tris-HCl neutralisiert und erneut für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei -20°C eingefroren.

Für die Westernblot-Analyse wurden jeweils 30 µl der Proben auf Eis aufgetaut und mit 10 µl nicht-reduzierendem Laemmli-Inkubationspuffer versetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden 5 min bei 95°C gekocht und auf ein 12,5 %iges Laemmli-SDS-Gel aufgetragen.

2.2.3.12 Kofaktor-Assay

Borrelienzellen aus Kultur wurden bei 5000 x g für 30 min bei 4°C sedimentiert, 2 mal mit 500 µl PBS-Puffer gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und gezählt (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.4). Jeweils 10 µl Zellsuspension mit je 1×10^7 Zellen wurden entweder ohne Faktor H (Negativkontrolle), oder mit 50 ng Faktor H in PBS, versetzt. Die Proben wurden für 60 min bei Zimmertemperatur inkubiert, um Faktor H an die Borrelienoberfläche zu binden.

Anschließend wurden die Zellen 4 mal mit 1 ml PBS gewaschen um ungebundenen Faktor H zu entfernen. Das Zellsediment wurde anschließend in 50 µl einer PBS-Lösung mit 1 µg Faktor I und 0,5 µg C3b resuspendiert. Alle Proben wurden für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert und der Überstand mit 10 µl Laemmli-Inkubationspuffer und 2,5 µl Mercaptoethanol versetzt und anschließend bei -20°C eingefroren.

Als Positivkontrolle wurden 50 ng Faktor H mit 1 µg Faktor I und 0,5 µg C3b in 50 µl PBS versetzt und wie oben beschrieben inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Zellen ohne Faktor H, sowie 50 µl PBS-Lösung mit Faktor I und C3b.

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis aufgetaut, und bei 95°C für 5 min erhitzt, bevor diese auf ein 12,5 %-Laemmli-SDS-Gel aufgetragen wurden.

2.2.3.13 Opsonisierungstest

Borrelienzellen aus einer gut bewachsenen Kultur wurden bei 5000 x g für 30 min bei 4°C sedimentiert, mit 500 µl VBS gewaschen, wiederum bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und in 500 µl VBS resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.4) und je 2×10^8 Zellen in 150 µl VBS mit 150 µl NHS in VBS (1:5), 150 µl NHS in 2 x EGTA (1:5) bzw. 150 µl 2 x EDTA (1:5) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit 500 µl PBS-NaCl gewaschen und bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 100 µl Hydroxylamin-Lösung für 1 h bei 37°C. Zuletzt wurden die Zellen bei 14 000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert, der Überstand mit 10 µl 2 M HCl neutralisiert und bei -20°C gelagert.

Für die SDS-PAGE im 12,5 % Laemmli-Gel wurden die Reaktionsansätze auf Eis aufgetaut und je 30 µl Reaktionsansatz bei 95°C für 5 min mit 12,5 µl reduzierendem Laemmli-Inkubationspuffer, der 2,5 µl Mercaptoethanol enthielt, inkubiert.

3. Ergebnisse

Die Lyme-Borreliose ist die in Europa und Nordamerika häufigste vektorübertragene Anthropozoonose und besitzt eine hohe klinische Relevanz (CDC, 2006; Robert Koch Institut, 2005). Im Mittelmeerraum ist *Borrelia lusitaniae* die in infizierten Zecken überwiegende Borrelienspezies, regional begrenzt wurde sie auch in weiten Teilen Südeuropas aus Zecken isoliert. Die Pathogenität dieser Genospezies für den Menschen ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, jedoch wird ein entsprechendes Potential vermutet. Die kulturelle Anzucht des Erregers aus Patientenmaterial wurde bisher in zwei Fällen dokumentiert (da Franca et al., 2005; de Carvalho et al., 2008).

3.1 Untersuchungen zur Serumempfindlichkeit von *B. lusitaniae*

3.1.1 Analyse des Proteinexpressionsmusters von verschiedenen *B. lusitaniae*-Stämmen

Isolate verschiedener Lyme-Borrelienspezies unterscheiden sich in Bezug auf ihre Serumempfindlichkeit. Stämme der Spezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. spielmanii* sind überwiegend dazu in der Lage, in humanem Serum die Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 des alternativen Weges der Komplementaktivierung zu binden und so im Serum zu überleben. Dem gegenüber sind *B. garinii*-Stämme zum größten Teil serumsensibel und werden durch humanes Komplement in wenigen Minuten lysiert.

Vor dem Hintergrund dieser Heterogenität innerhalb der Lyme-Borrelienspezies wurden insgesamt 16 Isolate von *B. lusitaniae* verschiedenen geographischen und biologischen Ursprungs untersucht. Hierunter befanden sich 8 Zeckenisolate und ein humanes Isolat aus Portugal sowie 7 Zeckenisolate aus Süddeutschland.

Zunächst sollte das Proteinexpressionsmusters von *B. lusitaniae* analysiert werden, um die Frage zu beantworten, ob bereits innerhalb der Spezies eine Heterogenität in der Proteinexpression, sowie Unterschiede zu den serumresistenten Genospezies *B. burgdorferi* und *B. afzelii*, sowie zu den serumsensiblen *B. garinii* erkennbar sind.

Zur Analyse des Proteinexpressionsmusters wurden Ganzzelllysate der 16 *B. lusitaniae*-Isolate sowie der Referenzstämme *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 hergestellt (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.6), mittels Tris/Tricin-SDS-PAGE separiert und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt (s. Methoden, Kapitel 2.2.1.5).

Wie in Abb. 3.1 dargestellt, wiesen alle *B. lusitaniae*-Isolate ein homogenes Proteinexpressionsmuster auf, welches sich von dem der beiden Referenzstämme geringfügig

unterschied. Bei allen *Borrelia*-Isolaten ergaben sich charakteristische, prominente Banden von 60 kD, 41 kD, ca. 35 kD, ca. 30 kD und ca. 21 kD, welche sich auf Grund früherer Analysen (Oschmann und Kraiczy, 1998) als Hsp60, Flagellin, OspB, OspA und OspC identifizieren ließen. Während Hsp60 und Flagellin hoch konservierte Proteine darstellen, sind OspA, OspB und OspC auf Grund ihrer Heterogenität in ihrem Molekulargewicht variabel. Diese Variabilität zeigte sich am deutlichsten bei den Isolaten SDA1-N1, LW2 und G1.

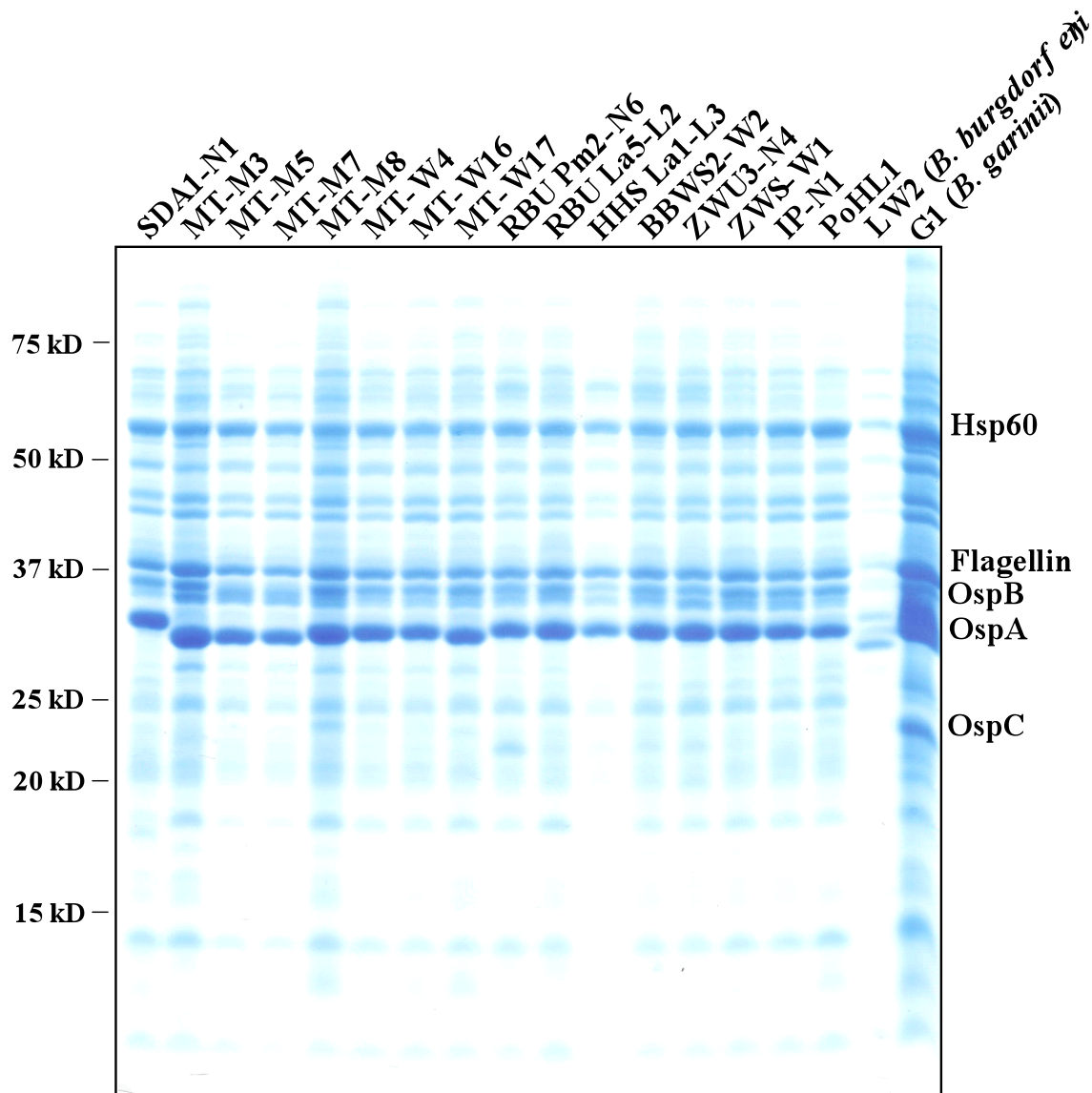


Abb. 3.1, Gelelektrophoretische Analyse des Proteinexpressionsprofils von *B. lusitaniae*-Isolaten. Ganzzelllysate (15 µg) von 16 *B. lusitaniae*-Isolaten sowie von *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 wurden mittels Tris/Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt. Rechts gekennzeichnet sind die prominenten Banden, links das Molekulargewicht des Größenstandards (Precision Plus Protein Standards, Fa. BioRad).

3.1.2 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *B. lusitaniae* in normalem Humanserum

Um erste Erkenntnisse über die Serumempfindlichkeit von *B. lusitaniae* zu erhalten, wurden die Borrelien mittels eines kolorimetrischen Serumbakterizidietests (CBA) (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.9) bezüglich ihrer Serumempfindlichkeit charakterisiert. Hierzu wurden $1,25 \times 10^7$ Spirochäten in 50 % normalem Humanserum (NHS), welches keine spezifischen Antikörper gegen Borrelien enthielt, zusammen mit einem pH-Indikator (Phenolrot) über einen Zeitraum von 10 Tagen inkubiert. Zusätzlich wurden Kontrollen mit hitzeinaktiviertem NHS mitgeführt. Stoffwechselaktive, sich vermehrende Borrelien sezernieren Stoffwechselprodukte in das Medium und die damit einhergehende pH-Wertveränderung führt zu einem Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb. Dieser Farbumschlag korreliert direkt mit einer Abnahme der Extinktionswerte, welche bei 562/630 nm für den Versuchszeitraum von 10 Tagen alle 24 Stunden gemessen wurden. Abbildung 3.2 zeigt die ermittelten Wachstumskurven der für die 16 untersuchten *B. lusitaniae*-Isolate repräsentativen Stämme MT-M8, RBU Pm2-N6, IP-N1 und PoHL1. Die Wachstumskurven der anderen *B. lusitaniae*-Isolate sind im Anhang, Abb. A1 aufgeführt. Abb. 3.2 zeigt außerdem zum Vergleich die Wachstumskurven der Isolate FEM1-D15 (*B. afzelii*), A14S (*B. spielmanii*), B31-e2 (*B. burgdorferi*) und G1 (*B. garinii*).

Alle untersuchten Isolate vermehrten sich in hitzeinaktiviertem Serum, was an einem Farbumschlag des Mediums und der damit einhergehenden Abnahme der Extinktionswerte zu erkennen war.

In 50 % NHS, welches aktives Komplement enthielt, unterschieden sich die Wachstumskurven der serumresistenten Stämme FEM1-D15, A14S und B31-e2 kaum von denen der entsprechenden hitzeinaktivierten Kontrollen. Das serumsensible *B. garinii*-Isolat G1 zeigte dagegen in NHS keinen Farbumschlag des Mediums, was auf eine Abtötung der Borrelienzellen durch Komplement zurückzuführen ist. Entsprechend blieben die gemessenen Extinktionswerte konstant bei den Ausgangswerten.

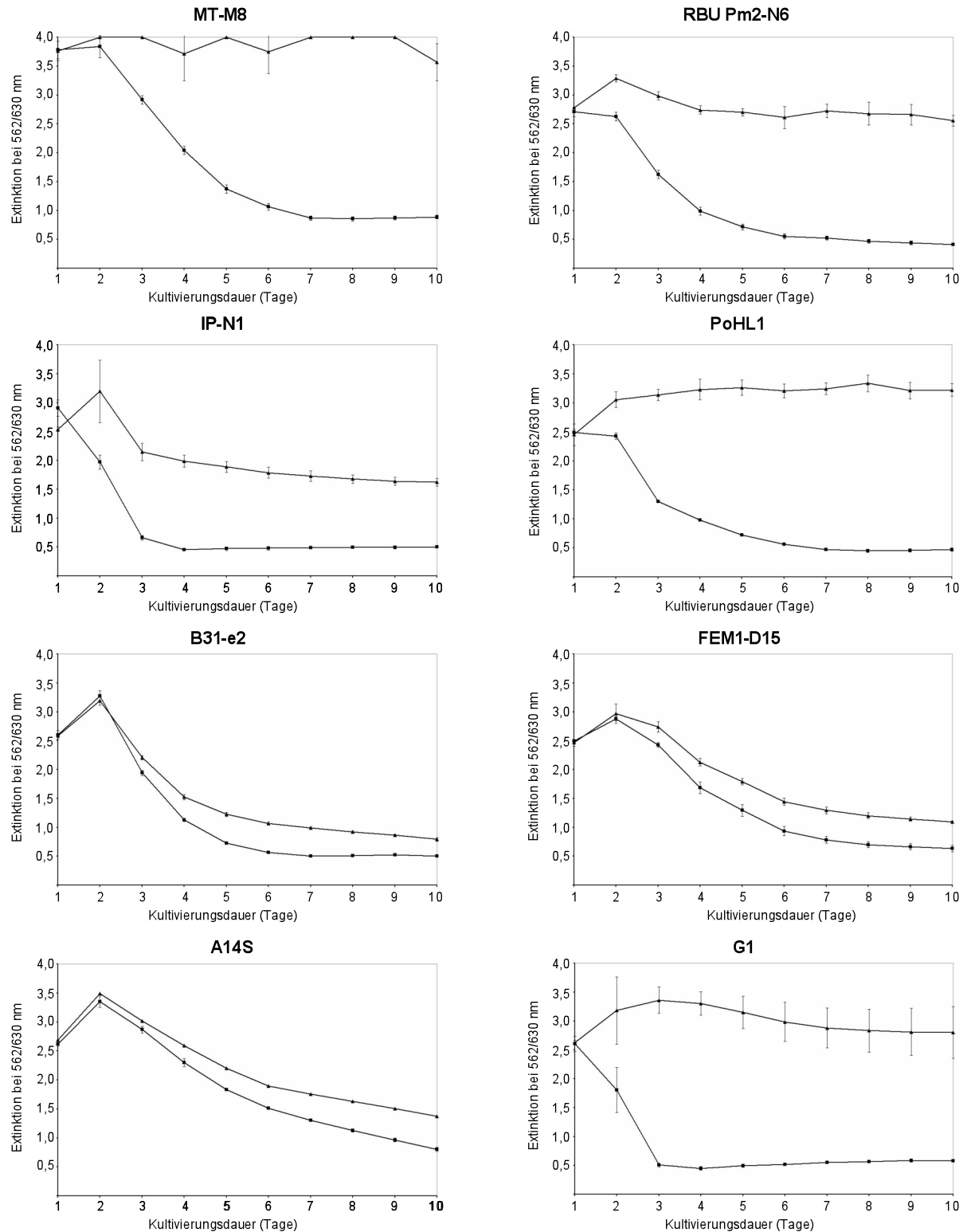


Abb. 3.2, Nachweis der Serumempfindlichkeit von *B. lusitaniae*. Der Serumbakterizidietest wurde mit den *B. lusitaniae*-Isolaten MT-M8, RBU Pm2-N6, IP-N1 und PoHL1 sowie den serumresistenten Vergleichsstämmen B31-e2 (*B. burgdorferi*), FEM1-D15 (*B. afzelii*) und A14S (*B. spielmanii*) und dem serumsensiblen Vergleichsstamm G1 (*B. garinii*) durchgeführt. $1,25 \times 10^7$ Borrelienzellen wurden in 50 % NHS (\blacktriangle) bzw. 50 % hiNHS (\blacksquare) über 10 Tage bei 33°C inkubiert und die Extinktionswerte alle 24 h photometrisch gemessen. Die Tests erfolgten in 3facher Ausführung an unterschiedlichen Tagen. Die dargestellten Wachstumsverläufe repräsentieren jeweils ein Experiment bestehend aus 3 Parallelansätzen, deren Extinktionswerte gemittelt und mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt wurden.

Von den untersuchten *B. lusitaniae*-Isolaten war nur IP-N1 dazu in der Lage, kontinuierlich in Gegenwart von 50 % NHS zu wachsen. Hierbei zeigte die Wachstumskurve eine Abnahme der Extinktionswerte, jedoch nicht in gleichem Maße wie in der hitzeinaktivierten Kontrolle oder wie bei den serumresistenten Borrelienstämmen. Das Wachstum dieses Stammes wurde deshalb als intermediär-serumresistent gewertet. Die Isolate SDA1-N1, MT-M3, MT-M5, MT-M7, MT-M8, MT-W4, MT-W16, MT-W17, RBU Pm2-N6, RBU La5-L2, HHS La1-L3, BBWS2-W2, ZWU3-N4, ZWS-W1 sowie PoHL1 waren unter den entsprechenden Bedingungen nicht in der Lage sich zu vermehren. Die Extinktionswerte stagnierten auf dem Ausgangsniveau, entsprechend des Wachstums des serumsensiblen *B. garinii*-Stammes G1. Somit waren mit Ausnahme von IP-N1 alle untersuchten *B. lusitaniae*-Stämme als serumsensibel zu klassifizieren.

Eine vorübergehende Zunahme der Extinktionswerte innerhalb des ersten Versuchstages trat bei allen Testansätzen auf und ist auf die Reduktion des pH-Indikators Phenolrot unter Sauerstoffeinwirkung vor Verschluss der Mikrotiterplatte zurückzuführen.

3.1.3 Untersuchung aktivierter Komplementkomponenten auf der Oberfläche von *B. lusitaniae*

Um die Ablagerung aktivierter Komplementkomponenten der verschiedenen Stufen der Komplementkaskade auf der Zelloberfläche der *B. lusitaniae*-Stämme nachzuweisen, wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.10) durchgeführt. Hierzu wurden die *B. lusitaniae*-Isolate in 25 % NHS für 30 min bei 37°C inkubiert, wobei nach Aktivierung Komplementkomponenten auf der Oberfläche der Spirochäten abgelagert werden sollten. Die Komplementkomponenten C3, C6 und C5b-9, welche sequenziell aufeinander folgende Stufen der Komplementkaskade widerspiegeln, wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert. Gleichzeitig erfolgte eine Gegenfärbung der Borrelienzellen mit dem DNA-bindenden Fluorochrom DAPI.

Als Kontrolle wurden die Borrelienstämmen parallel mit 25 % hitzeinaktiviertem NHS inkubiert. Zusätzlich wurden die serumresistenten Stämme *B. burgdorferi* B31-e2, *B. afzelii* FEM1-D15 und *B. spielmanii* A14S sowie der serumsensible *B. garinii*-Stamm G1 als Kontrollen mitgeführt. Abb. 3.3 zeigt den Immunfluoreszenztest mit hitzeinaktiviertem Serum des *B. lusitaniae*-Stammes PoHL1, stellvertretend für alle durchgeführten Negativkontrollen. Die Ergebnisse von 4 repräsentativen *B. lusitaniae*-Isolaten sowie der Kontrollstämmen *B. burgdorferi* B31-e2 und *B. garinii* G1 sind in Abb. 3.4 dargestellt. Die Abbildungen der weiteren zwölf untersuchten *B. lusitaniae*-Stämme sowie von *B. afzelii* FEM1-D15 und

B. spielmanii A14S sind dem Anhang, Abb. A2 zu entnehmen. Für die Abbildungen wurde jeweils der gleiche Ausschnitt des Präparates mit verschiedenen Fluoreszenzfiltern fotografiert, die Übereinanderlagerung der Aufnahmen erfolgte mittels der Differenz-Funktion von Adobe Photoshop Elements 5.0.

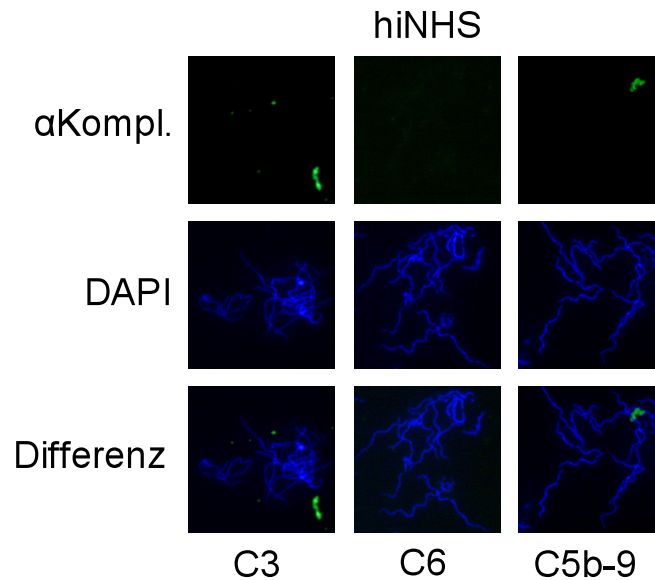


Abb. 3.3, Negativer Nachweis der Ablagerung von Komplement nach Inkubation von Borrelienzellen mit hitzeinaktiviertem NHS. 6×10^6 Borrelienzellen wurden in 25 % hitzeinaktiviertem NHS für 30 min bei 37°C inkubiert und die Komplementkomponenten C3, C6 und C5b-9 (terminaler Membranangriffskomplex, TCC) auf der Oberfläche der Zellen mittels indirektem Immunfluoreszenztest nachgewiesen. Hierzu wurden polyklonale Antikörper gegen die Komplementkomponenten C3 bzw. C6 und ein monoklonaler spezifischer Antikörper gegen den humanen terminalen Membranangriffskomplex (C5b-9) verwendet. Die Gegenfärbung der bakteriellen DNA erfolgte mit DAPI.

In den Kontrollen mit hitzeinaktiviertem Serum ließen sich, wie erwartet, keine Komplementkomponenten auf der Borrelienoberfläche detektieren. Mittels der DAPI-Färbung wurde gleichzeitig das Vorhandensein von Borrelien im entsprechenden Bildausschnitt nachgewiesen.

Bei dem serumresistenten *B. burgdorferi*-Isolat B31-e2 und dem *B. spielmanii*-Isolat A14S fluoreszierten wenige Zellen bei Detektion von C3, im Vergleich mit der DAPI-Färbung war jedoch zu erkennen, dass nur ein Bruchteil der vorhandenen Borrelien fluoreszierte. Bei Detektion von C6 bzw. des terminalen Membranangriffskomplexes (C5b-9) waren keine Ablagerungen von Komplement mehr nachweisbar. Manche fluoreszierenden Zellen enthielten keine DNA und sind deswegen als tote Zellhüllen anzusehen (Herzberger et al., 2007). Bei dem serumresistenten *B. afzelii*-Isolat FEM1-D15 konnten nach Inkubation mit 25 % Serum keine Ablagerung von C3, C6 oder C5b-9 nachgewiesen werden.

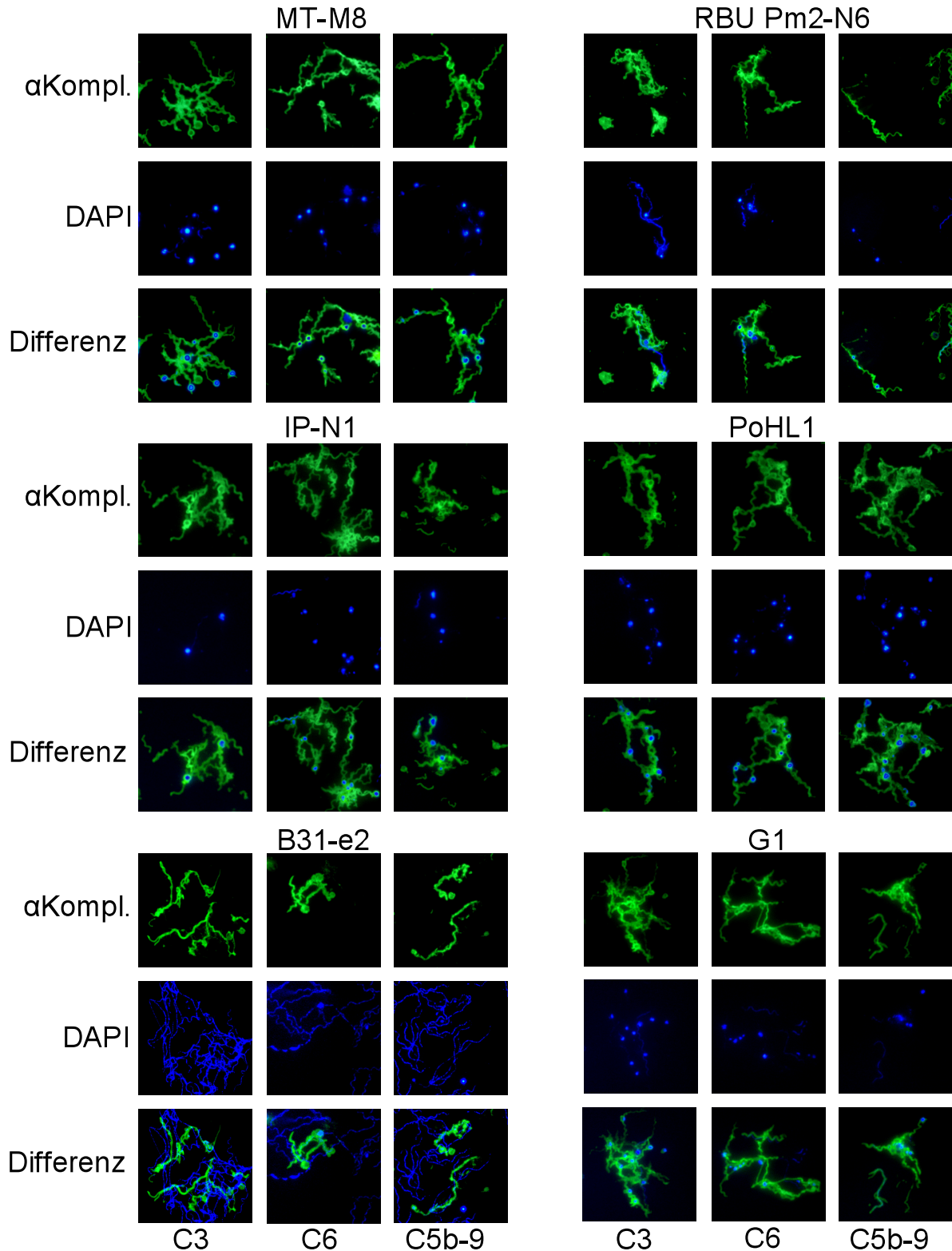


Abb. 3.4, Nachweis der Ablagerung aktivierter Komplementkomponenten auf Borrelienzellen. 6×10^6 Borrelienzellen wurden in 25 % NHS für 30 min bei 37°C inkubiert und die Komplementkomponenten C3, C6 und C5b-9 mittels IFT nachgewiesen. Für die Detektion dienten polyklonale Antikörper gegen die Komplementkomponenten C3 bzw. C6 und ein monoklonaler spezifischer Antikörper gegen den humanen terminalen Membranangriffskomplex (C5b-9). Die Gegenfärbung der bakteriellen DNA erfolgte mit DAPI. Gezeigt sind die *B. lusitaniae*-Isolate MT-M8, RBU Pm2-N6, IP-N1 und PoHL1 sowie das serumresistente *B. burgdorferi*-Isolat B31-e2 und das serumsensible *B. garinii*-Isolat G1.

Bei dem serumsensiblen *B. garinii*-Stamm G1 waren alle Zellen für C3, C6 oder C5b-9 positiv. Die DAPI-Färbung ergab, dass die DNA konzentriert an einem Punkt lokalisiert vorlag. An dieser Stelle zeigte sich meist eine Auftreibung der Bakterienzellwand (sog. Bleb). Ein entsprechendes Bild zeigten die 16 untersuchten *B. lusitaniae*-Isolate. Alle Zellen wiesen eine homogene Fluoreszenz für die 3 nachgewiesenen Komplementkomponenten auf. Wie bei dem *B. garinii*-Stamm G1 ließ sich eine Konzentrierung der DNA in den Blebs nachweisen.

Im Verlauf des Versuchs wurde nach Inkubation der Borrelien mit NHS vor der Fixierung auf dem Objektträger zusätzlich eine Nativmikroskopie durchgeführt. Hierbei konnte bei *B. garinii* G1 und den *B. lusitaniae*-Isolaten eine deutliche Abnahme der Motilität der Borrelien sowie die Bildung von Ausstülpungen der Zellmembran beobachtet werden.

Der Nachweis der massiven Komplementablagerung, der Motilitätsverlust sowie die drastischen morphologischen Veränderungen unterstützten die Klassifizierung von *B. lusitaniae* als überwiegend serumsensible Borrelienspezies, welche anhand des Serumbakterizidietests (s. Kapitel 3.1.2) bereits vermutet wurde.

3.1.4 Grundlegende Studien zur Komplementaktivierung von *B. lusitaniae*

Mit einer Ausnahme zeigten sich die 16 untersuchten Isolate der Genospezies *B. lusitaniae* in den durchgeführten Tests phänotypisch als serumsensibel. In der Literatur wird beschrieben, dass Borrelien im antikörperfreien Serum sowohl den klassischen Weg als auch den alternativen Weg aktivieren können (Breitner-Ruddock et al., 1997; Kraiczy et al., 2000; van Dam et al., 1997). Um zu untersuchen, über welchen der beiden Wege *B. lusitaniae* das Komplementsystem aktiviert, wurde ein Opsonisierungstest (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.13) durchgeführt. Hierzu wurden je 2×10^8 Borrelienzellen in je 10 %igem NHS, NHS-EGTA oder NHS-EDTA für 30 min bei 37°C inkubiert. EGTA hemmt den klassischen Weg der Komplementaktivierung, EDTA dagegen den klassischen und den alternativen Weg. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und auf der Bakterienoberfläche kovalent gebundenes C3b durch Behandlung mit Hydroxylamin abgespalten. Die jeweiligen Überstände sowie gereinigtes C3b (Positivkontrolle), wurden auf ein 12,5 % Laemmli-SDS-Gel aufgetragen und unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die separierten Proteine auf Nitrocellulose transferiert und mittels Westernblot analysiert (s. Abb. 2.2.1.3).

Das unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennte C3-Molekül ließ sich anhand der α' -Kette (105 kD) und der β -Kette (75 kD) identifizieren. Bei den 16 untersuchten *B. lusitaniae*-Isolaten konnten nach Inkubation mit 10 % NHS die 75 kD β -Kette, die 68 kD α' -Kette,

sowie die 43 kD α' 2-Kette detektiert werden (s. Abb. 3.5 a). Die β -Kette ist Bestandteil von C3b und iC3b und die α' 1-Kette sowie die α' 2-Kette kennzeichnen iC3b.

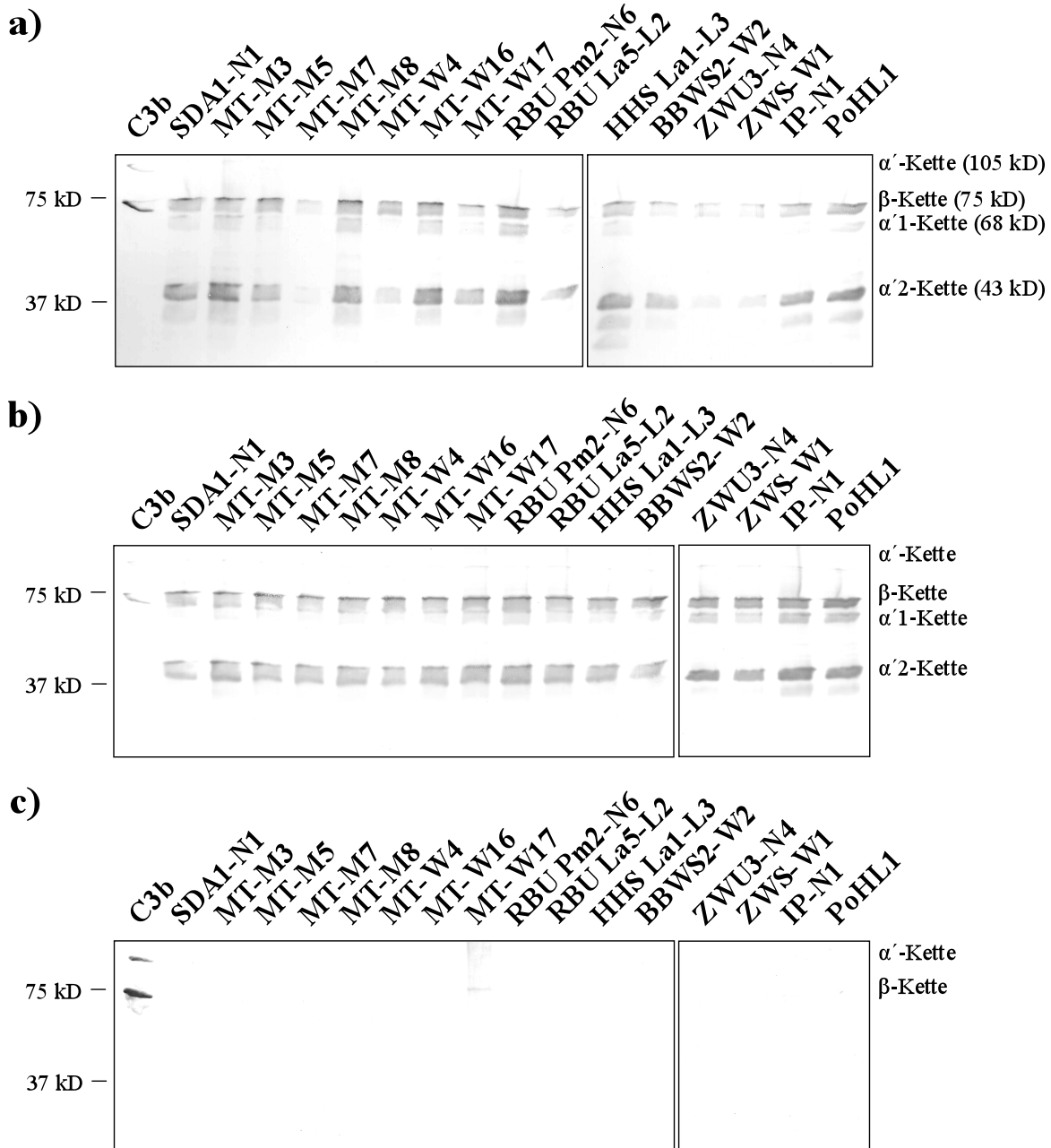


Abb. 3.5, Nachweis von abgelagerten C3-Fragmenten nach Opsonisierung von *B. lusitaniae* in NHS, NHS-EGTA und NHS-EDTA. Die Borrelienzellen (2×10^8) wurden in je 10 %igem NHS, NHS-EGTA bzw. NHS-EDTA für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und kovalent gebundene C3-Fragmente durch Hydroxylamin abgespalten. Die Proteine wurden mittels 12,5 % Laemmli-SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen anti-C3-Antikörper. Gereinigtes C3b diente als Größenstandard und Positivkontrolle. Rechts gekennzeichnet sind die identifizierten C3-Spaltprodukte, links das Molekulargewicht des Größenstandards (Precision Plus Protein Standards, Fa. BioRad).

Alle *B. lusitaniae*-Isolate zeigten das gleiche Muster an C3-Spaltprodukten und waren somit in der Lage, C3 zu aktivieren. Nach Inkubation der Borrelien in 10 % NHS-EGTA konnte kein Unterschied im C3-Muster im Vergleich zu den NHS-behandelten Zellen festgestellt werden. Auch hier ließen sich bei allen Isolaten sowohl die β -Kette, als auch die α' 1-Kette und die α' 2-Kette detektieren (s. Abb. 3.5 b). Da EGTA die Aktivierung über den klassischen Weg hemmt, muss die Opsonisierung der Borrelienzellen mit C3, hauptsächlich über den alternativen Weg erfolgt sein. Für Borrelienzellen, die in 10 % NHS-EDTA inkubiert wurden, konnten, wie erwartet, keine C3-Fragmente nachgewiesen werden, da EDTA beide Aktivierungswege blockiert (s. Abb. 3.5 c).

3.2 Analyse der Faktor H-Bindung bei *B. lusitaniae*

3.2.1 Identifikation Faktor H-bindender Proteine bei *B. lusitaniae* mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse

Um zu untersuchen, ob *B. lusitaniae* in der Lage ist, Proteine der Faktor H-Familie zu binden, wurde eine Ligandenaffinitätsblotanalyse durchgeführt. Hierzu wurden Zelllysate (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.6) der 16 Isolate gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse auf Bindung von Proteinen der Faktor H-Familie untersucht. Zusätzlich wurden Zelllysate von *B. burgdorferi* LW2, welcher die Faktor H-bindenden Proteine BbCRASP-1 bis -5 exprimiert, und des CRASP-negativen *B. garinii*-Stammes G1 als Kontrollen mit in die Analyse eingeschlossen.

Das Ergebnis der Ligandenaffinitätsblotanalyse ist in Abb. 3.6 dargestellt. Hierbei zeigte das Isolat MT-M8 ein Faktor H-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kD, während die anderen *B. lusitaniae*-Isolate keine spezifische Bindung von Faktor H aufwiesen. Bei *B. burgdorferi*-Stamm LW2 ließen sich 3 Faktor H-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von 25,9 kD, 19,8 kD und 17,7 kD, welche BbCRASP-1, BbCRASP-3 und BbCRASP-5 entsprechen, detektieren (Kraiczy et al., 2001a). Im Lysat des *B. garinii*-Isolats G1 konnte kein Faktor H-bindendes Protein nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Detektion von Flagellin, eines 41 kD-Proteins, welches konstitutiv von allen Borrelien exprimiert wird, zeigt, dass ähnliche Mengen an Zelllysat (mit Ausnahme des Zelllysats von *B. garinii* G1) aufgetragen wurden. Warum Flagellin von *B. burgdorferi* LW2 nicht mit dem verwendeten Antikörper reagiert, lässt sich nicht erklären.

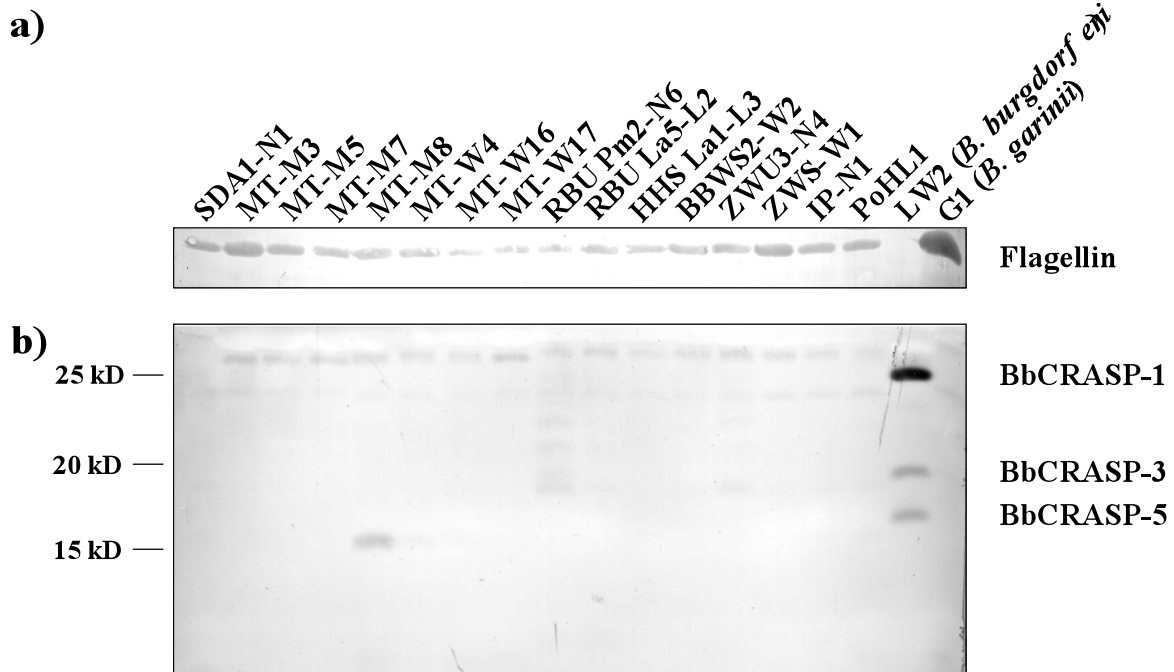


Abb. 3.6, Identifikation von Faktor H-bindenden Proteinen bei *B. lusitaniae*. Ganzzelllysate (30 µg) der verschiedenen Borrelienisolats wurden in einem 10 % Tris/Tricin-SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit NHS als Quelle für Faktor H inkubiert und spezifisch gebundener Faktor H mit einem polyklonalen anti-Faktor H-Antikörper detektiert. Flagellin wurde mit dem monoklonalen Antikörper L41 1C11 nachgewiesen. Rechts sind die identifizierten Faktor H-bindenden Proteine des Isolats LW2 gekennzeichnet, links ist das Molekulargewicht des Größenstandards (Precision Plus Protein Standards, Fa. BioRad) angegeben. a) Detektion von Flagellin, b) Detektion von Faktor H-bindenden Proteinen.

3.2.2 Analyse der an *B. lusitaniae* gebundenen Proteine der Faktor H-Familie

Um die Frage zu beantworten, ob *B. lusitaniae* auch als intakte Zellen in der Lage sind, Proteine der Faktor H-Familie zu binden, wurden Serumadsorptionstests (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.11) durchgeführt. Hierfür wurden von den 16 *B. lusitaniae*-Isolaten je 10^9 native Zellen in komplementinaktiviertem Serum (NHS-EDTA) inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen. Die an die Bakterienoberfläche spezifisch gebundenen Serumproteine wurden anschließend eluiert und mittels Westernblot analysiert. Die Methode des Serumadsorptionstests bietet auf Grund der hohen Zellzahl eine höhere Sensitivität als die Ligandenaffinitätsblotanalyse, für welche Ganzzelllysate verwendet werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, verschiedene Mitglieder der Faktor H-Familie anhand ihres Molekulargewichts nachzuweisen.

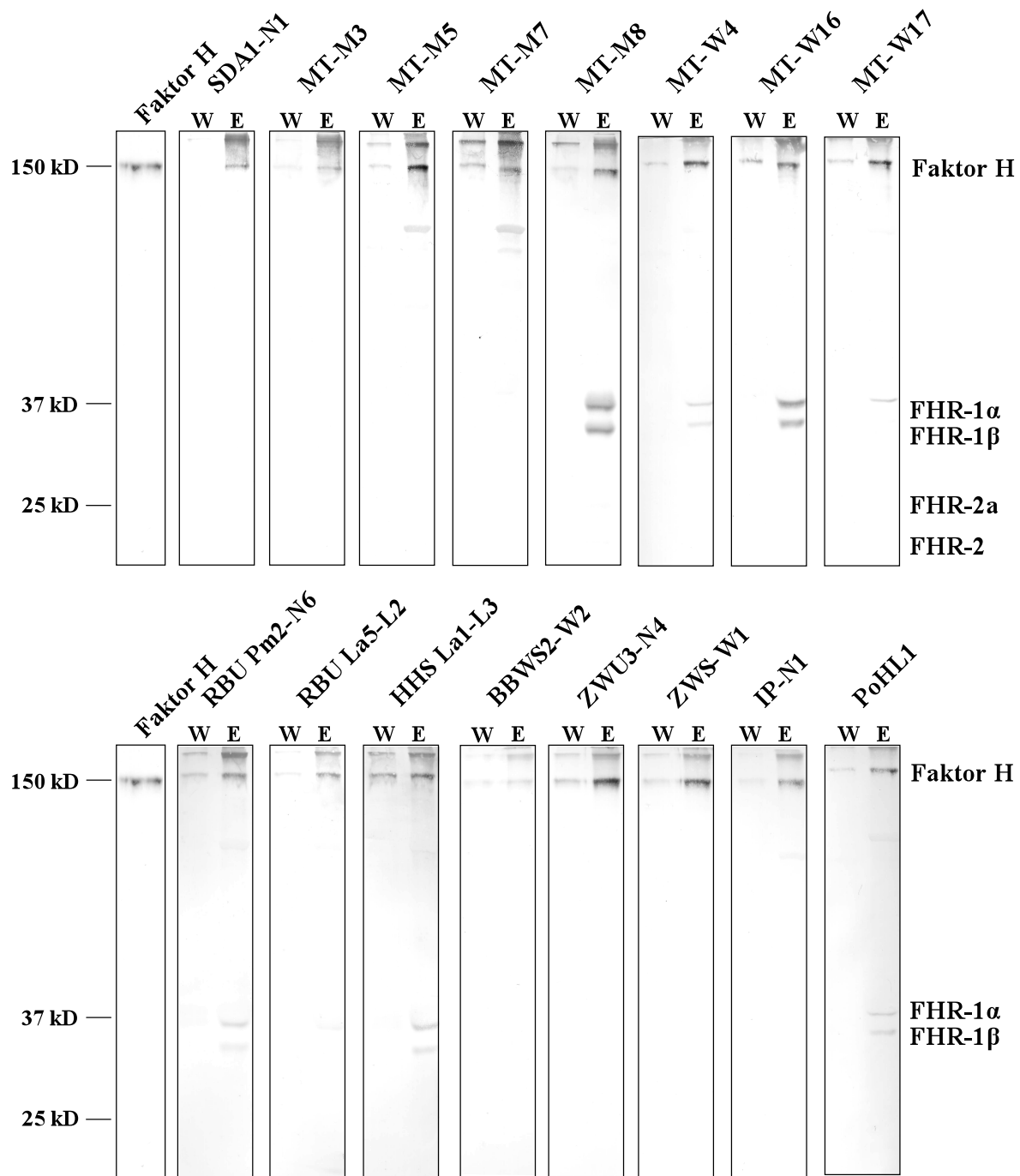


Abb. 3.7, Nachweis der Bindung von Proteinen der Faktor H-Familie an intakte Borrelienzellen. Intakte Borrelienzellen (10^9) wurden 60 min bei Zimmertemperatur in NHS-EDTA inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen. Die an die Zelloberfläche gebundenen Proteine wurden eluiert (E) und neben der letzten Waschfraktion (W) in einem 12,5 % Laemmli-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen anti-Faktor H-Antikörper. Gereinigter Faktor H diente als Kontrolle. Rechts markiert sind die detektierten Proteine der Faktor H-Familie, links das Molekulargewicht des Proteingrößenstandards (Precision Plus Protein Standards, Fa. BioRad).

Die Ergebnisse der Serumadsorptionstests sind in Abb. 3.7 dargestellt. Bei allen *B. lusitaniae*-Isolaten konnte eine Bindung von Faktor H nachgewiesen werden. Bezüglich der Bindung von FHR-1, welches in den zwei glykosylierten Formen FHR-1α (43 kD) und FHR-1β

(37 kD) im humanen Serum vorkommt, zeigten sich die Isolate heterogen. Die Stämme SDA1-N1, MT-M8, MT-W4, MT-W16, RBU Pm2-N6, RBU La5-L2, HHS La1-L3 und PoHL1 waren in der Lage, FHR-1, zumindest schwach, zu binden. Für Isolat MT-M8 ließ sich auch eine Bindung von FHR-2 (24 kD) und dessen glykosylierter Form FHR-2a (29 kD) nachweisen.

3.2.3 Untersuchung der Kofaktoraktivität von an Borrelien gebundenem Faktor H

Im Serumbakterizidietest waren von den 16 untersuchten *B. lusitaniae*-Isolaten 15 eindeutig als serumsensibel zu klassifizieren. Der Nachweis der abgelagerten Komplementfaktoren C3, C6 sowie des terminalen Membranangriffskomplexes auf der Zelloberfläche mittels indirektem Immunfluoreszenztest unterstützt diese Klassifizierung. Trotzdem zeigten alle Isolate im Serumadsorptionstest eine Bindung von Faktor H. In der Literatur ist beschrieben, dass Bakterien, welche Faktor H aus dem Serum akquirieren, dessen Kofaktoraktivität für die Serinprotease Faktor I nutzen, um abgelagertes C3b zu spalten und so die Aktivierung der Komplementkaskade zu hemmen (Kraiczy und Würzner, 2006; Lambris et al., 2008). Deshalb wurde untersucht, ob an die Oberfläche von *B. lusitaniae* gebundener Faktor H in der Lage ist, ebenfalls Kofaktoraktivität zu entfalten.

Dazu wurden jeweils 4×10^7 Borrelienzellen 60 min bei Zimmertemperatur mit gereinigtem Faktor H inkubiert, die Zellen anschließend gewaschen und Faktor I sowie C3b im Überschuss hinzugegeben. Nach 60minütiger Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abzentrifugiert und mittels Tris/Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Spaltprodukte von C3b mittels Westernblot detektiert. Als Positivkontrolle wurden gereinigter Faktor H mit Faktor I und C3b unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert.

Wie in Abb. 3.8 dargestellt, sind in der Positivkontrolle die typischen Spaltprodukte von C3b, nämlich die α' -68 kD-, α' -46 kD- und α' -43 kD-Bande, zu erkennen. Kontrollen ohne Zugabe von Faktor H zeigten, wie erwartet, keine Spaltprodukte von C3b, sondern nur die α' - und β -Ketten des Proteins. Das bedeutet, dass *B. lusitaniae* keine endogene Fähigkeit zur Spaltung von C3b oder eigenständige Kofaktoraktivität besitzt. Wurden die Borrelien mit Faktor H inkubiert, waren Spaltprodukte von C3b äußerst schwach bei den Isolaten RBU Pm2-N6, HHS La1-L3, BBWS2-W2 und IP-N1 nachweisbar, während alle anderen Isolate keine Spaltprodukte von C3b und somit keine Kofaktoraktivität erkennen ließen. Obwohl der Westernblot prinzipiell keine quantitative Methode darstellt, lassen die im Vergleich mit der Positivkontrolle nur sehr schwachen Banden der C3-Spaltprodukte, sowie der Nachweis der

intakten α' -Kette bei allen *B. lusitaniae*-Isolaten auf eine sehr geringe Kofaktoraktivität des gebundenen Faktor H-Moleküls schließen.

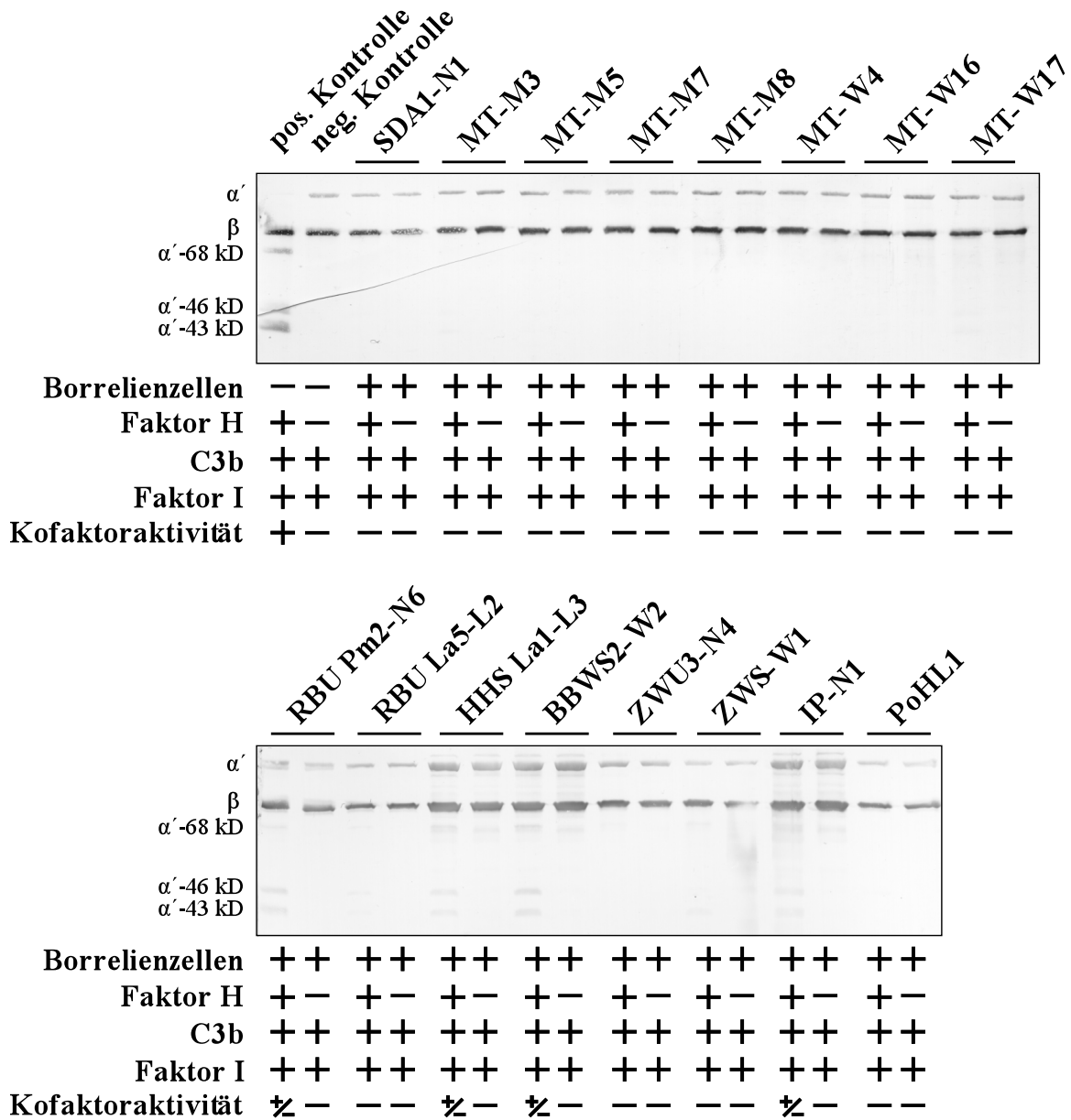


Abb. 3.8, Nachweis der Kofaktoraktivität von an *B. lusitaniae* gebundenem Faktor H. Borrelienzellen (4×10^7) wurden für 60 min bei Zimmertemperatur mit 50 ng gereinigtem Faktor H inkubiert und dann gewaschen. Anschließend wurden Faktor I und C3b hinzugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde mittels Laemmli-SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Spaltprodukte von C3b mit einem polyklonalen anti-C3-Antikörper detektiert. Links sind die Spaltprodukte von C3b gekennzeichnet.

3.3 Charakterisierung eines Faktor H-bindenden Proteins von *B. lusitaniae*

3.3.1 Amplifikation des für das Faktor H-bindende Protein kodierende Gen von *B. lusitaniae* MT-M8

Ziel weiterer Untersuchungen des Faktor H-bindenden Proteins von *B. lusitaniae* bestand in dessen Isolierung und anschließender Charakterisierung. Auf Grund der spezifischen Eigenschaft, Faktor H zu binden und seines Molekulargewichts von 16 kD wurde vermutet, dass es sich um ein Erp-homologes Protein handelte. Die für Erp-Proteine kodierenden Gene wurden im Folgenden in Anlehnung an Stevenson et al., 2006 und Brissette et al., 2007 als *erp*-Gene bezeichnet.

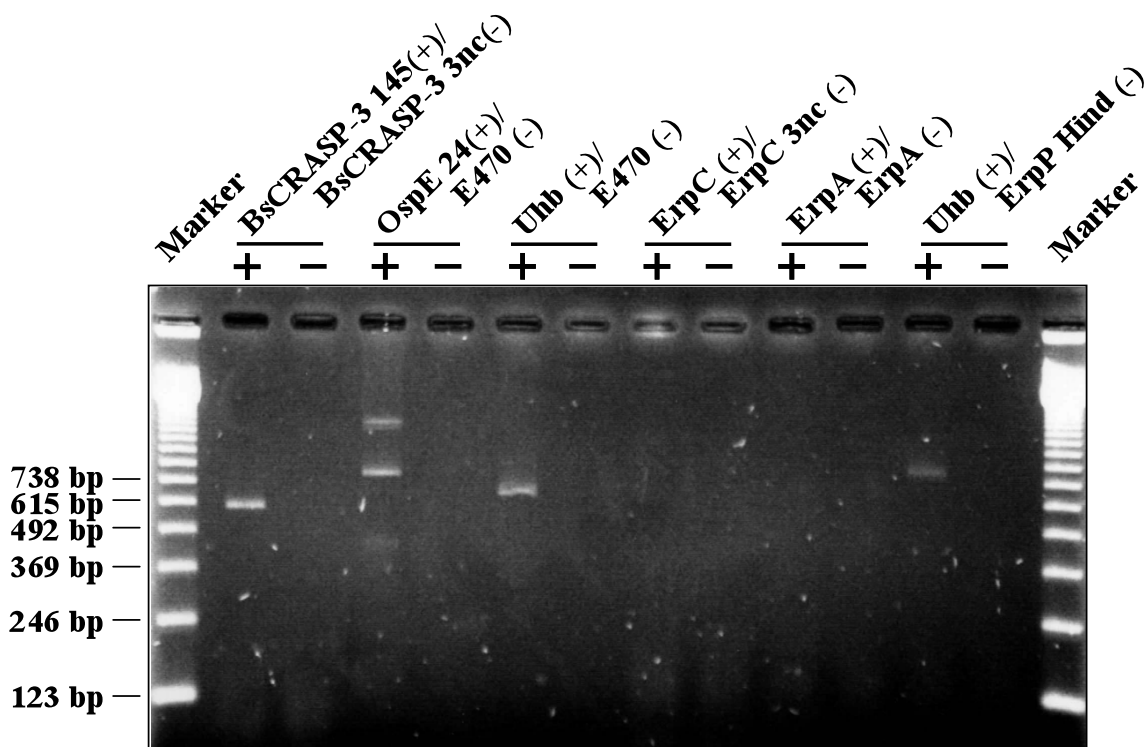


Abb. 3.9, Amplifikation *erp*-homologer Gensequenzen von *B. lusitaniae* MT-M8 mittels PCR. Die PCR erfolgte mit 2 µl Ganzzelllysates des Isolates MT-M8 und verschiedenen Oligonukleotiden, die für die Amplifikation von unterschiedlichen *erp*-Genen eingesetzt wurden. Für jeden Ansatz wurde eine Negativkontrolle (-) ohne Zugabe von DNA mitgeführt. Die Reaktionen wurden anschließend mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Links dargestellt sind die Fragmentgrößen des 123 bp DNA-Markers (Fa. Invitrogen).

Daher wurden zunächst *erp*-homologe Gensequenzen aus dem Gesamtgenom von MT-M8 mittels PCR (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.1) amplifiziert. Dazu wurden in einem Pilotansatz Oligonukleotide verwendet, mit denen bereits *erp*-orthologe Gene anderer Borreliengenspezies erfolgreich amplifiziert wurden (P. Kraiczy, persönliche Mitteilung).

Die Reaktionen wurden anschließend mittels Gelelektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.6) analysiert.

Wie in Abb. 3.9 dargestellt, gelang die spezifische Amplifikation eines Genabschnitts mit den Oligonukleotiden BsCRASP-3 145(+)/BsCRASP-3 3nc(-), Uhb (+)/E470 (-) und Uhb (+)/ErpP Hind (-), während die Oligonukleotide OspE 34(+)/E470(-) multiple Genabschnitte lieferten.

3.3.2 Klonierung *erp*-orthologer Gene von *B. lusitaniae* MT-M8 und Transformation von *E. coli*-Zellen

Von den 3 spezifisch amplifizierten Genabschnitten aus dem Gesamtgenom von MT-M8 wurde das größte Fragment, welches eine Länge von ca. 800 bp aufwies und mit den Oligonukleotiden Uhb (+)/ErpP Hind (-) amplifiziert werden konnte, für die Klonierung in einen Vektor ausgewählt. Es wurde vermutet, dass das längste Fragment einen möglichst großen Abschnitt des Gens enthielt. Die entsprechende PCR-Reaktion wurde gereinigt und das Amplifikat direkt mit Hilfe der TA Cloning-Methode in den Vektor pCR2.1 TOPO (s. Material, Kapitel 2.1.9) kloniert und anschließend in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.2). Mehrere Klone wurden über Blau/Weiß-Selektion auf Ampicillin-haltigen Agarplatten selektioniert, vermehrt und die Plasmide isoliert. Diese wurden anschließend mittels Restriktionsanalyse auf Vorhandensein inserierter DNA untersucht. Nach Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym EcoRI wurden die Reaktionen mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3.10) und Plasmide, welche ein ca. 800 bp großes Fragment enthielten, sequenziert (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.9).

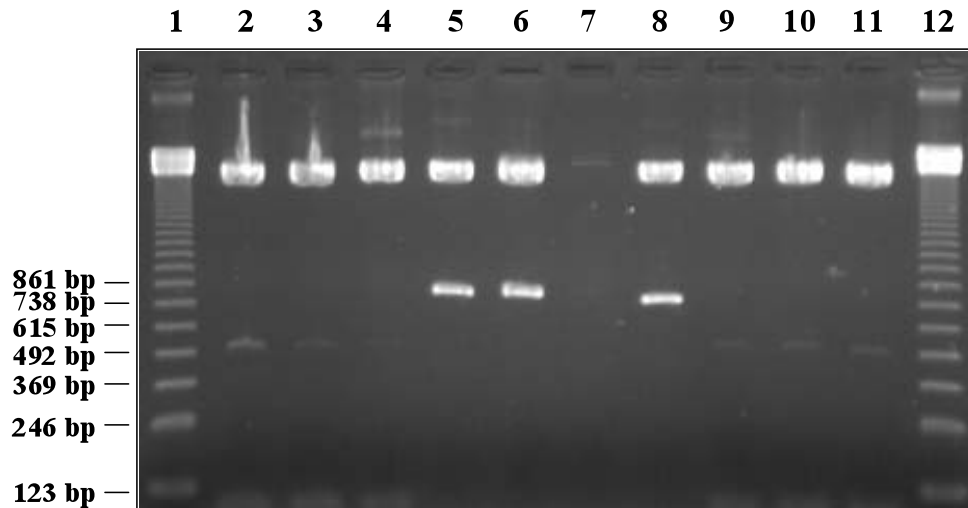


Abb. 3.10, Restriktionsanalyse verschiedener Insert-tragender Plasmide. Die isolierten Plasmide (250 ng) wurden mit 10 U des Restriktionsenzym *EcoRI* bei 37°C über Nacht hydrolysiert und elektrophoretisch in einem 2 % Agarose-Gel separiert (Spur 2-11). Auf den beiden äußeren Spuren wurde der 123 bp DNA-Marker (Fa. Invitrogen) aufgetragen. Die Fragmentgrößen des DNA-Standards sind links angegeben.

3.3.3 Analyse des *erp*-orthologen Gens von *B. lusitaniae* MT-M8

In Abb. 3.11 ist die erhaltene Sequenz des *erp*-orthologen Gens von *B. lusitaniae* MT-M8 dargestellt. Außerdem wurde ein Homologievergleich der Aminosäuresequenz des *Erp*-orthologen Proteins von MT-M8 mit Faktor H-bindenden Proteinen der *Erp*-Familie verschiedener *B. burgdorferi*-Stämme durchgeführt (s. Abb. 3.12) und anhand dessen ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (s. Abb. 3.13). Es ergaben sich mit der Jotun Hein-Methode Identitäten von 63,2 % mit *OspE* (Stamm 297), 61,2 % mit *ErpA* (Stamm B31), *ErpC* (Stamm B31) und *ErpP* (Stamm B31), 60,0 % mit *OspE* (Stamm N40) und 49,4 % mit *Erp47* (Stamm Sh-2-82). Das Faktor H-bindende Protein von *B. lusitaniae* MT-M8 wurde somit als Mitglied der *Erp*-Proteinfamilie in Analogie zu der Nomenklatur der CRASP-Proteine von *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. spielmanii* als BICRASP-3 (MT-M8) bezeichnet.

		5' - <u>GTTGGTTAA</u>	
<u>AATTACATTTGGATTTTATTACTATGTAATCGAAAATGTAACAAA</u> CTATATTTTTTAAAC			
[-35]		[-10]	
ATTTAAAAAAATTGTATTTACTCGAGATTGCATTACCCTTAAGTTTTAAAGAGAGGTTTT			
<u>ATGAATAAGAAAATGTTTATTATTTGTGCATTGTTTGTCTGATAAGTTCTTGCAAA</u> ACT	60		
M N K K M F I I C A L F V L I S S C K T	20		
GATGAAAGCATTTTAAAGTGAGCAAGAGAGTTTAAAGCAAGCAAGATAGTTTAAAGTAAGCAA	120		
D E S I L S E Q E S L S K Q D S L S K Q	40		
GATAGTTTAAAGTAAGCAAGGCCGTAGTTATACAATAAAATTCTCTGAATTTAGTGTAATAA	180		
D S L S K Q G R S Y T I K F S E F S V K	60		
ATTAAAAATAAAGATTCTAATAATAATAGCTGGAAAGATTTAGGAACTTTACTCATTAAA	240		
I K N K D S N N N S W K D L G T L L I K	80		
AAAGAAGAAGGTAAAGAAGGTTTAATTCTTGTGGGTTTACATAACAATTATCAAGGAGGA	300		
K E E G K E G L I L V G L H N N Y Q G G	100		
GGGCACAGTGCTACATTCTTTTTGCTAGAACCATCAGAAGTTAATAATTTTTTAAAGCA	360		
G H S A T F F L L E P S E V N N F L K A	120		
ATGACTAAAGGGGGATCATTTTGAAACTGGTATGTATTATGGATATAAGGATGAAGAAAGT	420		
M T K G G S F E T G M Y Y G Y K D E E S	140		
GTTAGAAATGGTATCAAAAATAAAAAGATAATAACAAAGATAGAAAAAATTAATGGGTCT	480		
V R N G I K N K K I I T K I E K I N G S	160		
CAACATATTACATTTTTTAGGAGATAAGATAAAAGGTTACCGGGTAGTATTGCTAAATAT	540		
Q H I T F L G D K I K G S P G S I A K Y	180		
GCAATACCACTAGAAGAGTTTAAAGAAGAATTTAAAATAGAAGTTTAAAGTATAATGGAGA	600		
A I P L E E F K K N L K *	192		
ATAAT <u>TATGAATAAAAAAGCTTTGATTGTTTGTGCTG</u> - 3'	660		

Abb. 3.11, Nukleotid- und Aminosäuresequenz des BICRASP-3 kodierenden Gens von *B. lusitaniae* MT-M8. Die Nukleotide und Aminosäuren wurden ab dem vermuteten ATG Startcodon nummeriert, das Stop-Codon (TAG) am Ende des offenen Leserahmens ist mit * bezeichnet. Die potentiellen Promotorsequenzen wurden mit -10 und -35 markiert, die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind unterstrichen und in kursiver Schreibweise gekennzeichnet. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des EditSey 4.00 Moduls des Programms DNASTAR erstellt.

BICRASP-3 (MT-M8)	MNK--KMFIICALFVLISCKTDESILSEQESLSKQDS-----LSKQDSLK
ErpA (B31)	MNKKMKMFIICAVFILTGACKIHTSYDEQSNGEVKKVK-----
ErpC (B31)	MNKKMKMFIICFIFALISSCKNHTLYDGQSNGEAKVK-----
ErpP (B31)	MNKKMKMFIICAVFILTGACKIHTSYDEQSSGEINHTLYDEQSNGLKLKK-----
Erp47 (Sh-2-82)	MNKKMKMFIICAVFILTGACKIHTSYDEQSSGEINHTLYDEQSNGLKLKK-----
OspE (297)	MNKKMKMFIICFIFALISSCKNHTLYDGQSNGEAKVK-----
OspE (N40)	MNKKMKMFIIVYAVFILTGACKIHTSYDEQSSGESKVK-----
BICRASP-3 (MT-M8)	QGRSYTIKFSEFSVKIKNKDSNNNSWKDLGTLLIKKEEGKEGLILVGLHNNYQGG-----
ErpA (B31)	-----IEFSEFTVKIKNKN--NSNNWADLGDLVVRKEKD-----GIETGLNAG-----
ErpC (B31)	-----IEFSEFTVKIKNKN--NSNNWADLGDLVVRKEED-----GIETGLNVGKGDS
ErpP (B31)	-----IEFSKFTVKIKNKD--NNSNWTDLGDLVVRKEEN-----GIDTGLNAG-----
Erp47 (Sh-2-82)	-----IEFSKFTVKIKNKD--NNSNWTDLGTLVVRKEEN-----GIDTGLNAG-----
OspE (297)	-----IEFSEFTVKIKNKN--NSNNWADLGDLVVRKEED-----GIETGLNVGKGDS
OspE (N40)	-----IEFSKFTVKIKNKD--KSGNWTDLGDLVVRKEEN-----GIDTGLNAG-----
BICRASP-3 (MT-M8)	---GHSATFFLLEPSEVNNFLKAMTKGGSFETGMYYGKDEESV--RNGIKNKKIITKIEK
ErpA (B31)	---GHSATFFSLEEEFLNNFIKAMTEGGSFKTSLYYGYNDEESD--KNVKNKEIKTKIEK
ErpC (B31)	TFAGYTATFFSLEESEVNNFIKAMTEGGSFKTSLYYGYKDEQSN--ANGIONKEIITKIEK
ErpP (B31)	---GHSATFFSLKESEVNNFIKAMTKGGSFKTSLYYGYKDEOSS--ANGIONKEIITKIES
Erp47 (Sh-2-82)	---GHSATFFSLKESEVNNFVKAMTEGGSFKTDEYYGYGKEQSNLDNGTSNKEIITKIEK
OspE (297)	TFAGYTATFFSLEESEVNNFIKAMTEGGSFKTSLYYGYKDEQSN--ANGIONKEIITKIEK
OspE (N40)	---GHSATFFSLEEEVNNFVKVMTTEGGSFKTSLYYGYKEEOSV--INGIONKEIITKIEK
BICRASP-3 (MT-M8)	INGSOHITFLGDKIKG--S--PGSIKAYAIPLLEEFKKNLK
ErpA (B31)	INDTEYITFLGDKINN--SAGGDKIABYAISLEELKKNLK
ErpC (B31)	IDDFEYITFLGDKIKD--S--GDKVVEYAILLEDLKKNLK
ErpP (B31)	INGABHIAFLGDKINNNGVG--GDKTAEYAIPLLEVKKNLK
Erp47 (Sh-2-82)	IDGTKYITFSGNKIKD--S--GDKVABYAILLEDLKKNLK
OspE (297)	IGSEYITFLGD-----KVAEYAISLEELKKNLK
OspE (N40)	IDGTEYITFSGDKIKN--S--GDKVABYAISLEELKKNLK

Abb. 3.12, Homologievergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Erp-Proteine mit BICRASP-3 (MT-M8). Für den Sequenzvergleich wurde die Jotun Hein-Methode mit dem Programm MegAlign 4.0 verwendet. Die Sequenzen der Proteine ErpA (Stamm *B. burgdorferi* B31) (Nr. ABL86601), ErpC (Stamm *B. burgdorferi* B31) (Nr. ABL86591), ErpP (Stamm *B. burgdorferi* B31) (Nr. AAF07678), Erp47 (Stamm *B. burgdorferi* Sh-2-82) (Nr. AAN17918), OspE (Stamm *B. burgdorferi* 297) (Nr. AAC34953) und OspE (Stamm *B. burgdorferi* N40) (Nr. AAA22959) wurden der Genbank entnommen.

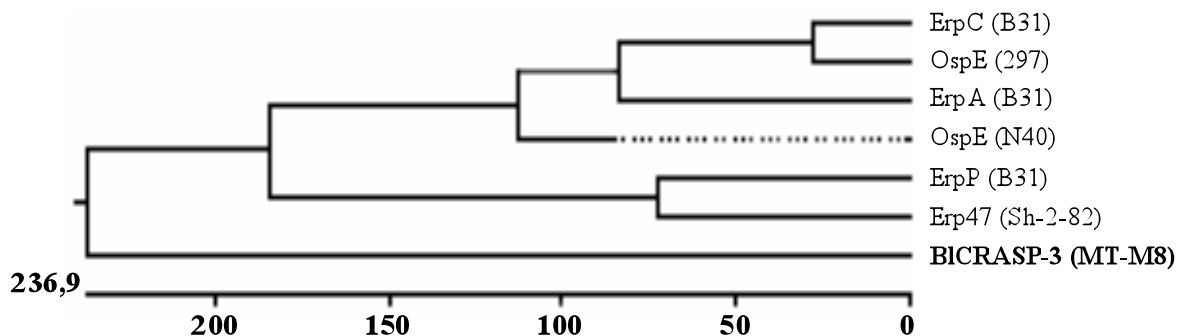


Abb. 3.13, Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Erp-Proteine. Der Stammbaum der aufgeführten Erp-Proteine wurde anhand des Homologievergleichs in Abb. 3.12 mit dem MegAlign 4.0 Modul des Programms DNASTAR erstellt.

3.3.4 Herstellung eines GST-Fusionsproteins von BICRASP-3

Für die Generierung eines GST-tragenden BICRASP-3-Fusionsproteins, wurden zunächst für die spezifische Amplifikation des BICRASP-3 kodierenden Gens von *B. lusitaniae* MT-M8 die Oligonukleotide BICRASP-3 55(+) BamHI und BICRASP-3 3nc(-) Xho (s. Material, Kapitel 2.1.8) konstruiert. Mit diesen wurde das in den pCR2.1 TOPO-Vektor klonierte BICRASP-3 kodierende Gen amplifiziert (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.1), gereinigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI hydrolysiert (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.5). Als Kontrolle wurde das Amplifikat vor und nach der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen im 2 % Agarosegel untersucht (s. Abb. 3.14).

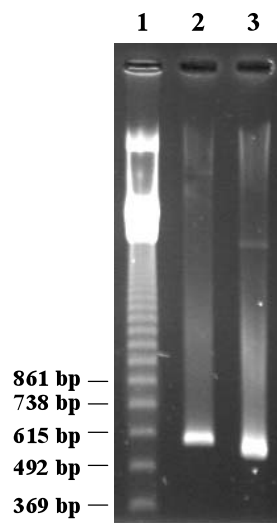


Abb. 3.14, Restriktionsanalyse des BICRASP-3 kodierenden Gens vor und nach Restriktion mit BamHI und XhoI. Das BICRASP-3 kodierende Gen wurde ausgehend von der in den Vektor pCR2.1 TOPO klonierten Sequenz mit den spezifischen Oligonukleotiden BICRASP-3 55(+) BamHI und BICRASP-3 3 nc(-) Xho mittels PCR amplifiziert, mit dem Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit gereinigt und 50 µl des Amplifikats mit je 80 U der Restriktionsendonukleasen BamHI und XhoI bei 37°C über Nacht inkubiert. Je 2 µl der PCR-Reaktion (Spur 2) und 5 µl des Restriktionsansatzes (Spur 3) wurden mittels Gelelektrophorese im 2 % Agarosegel analysiert. Als Größenstandard diente der 123 bp DNA-Marker (Fa. Invitrogen) (Spur 1), die Fragmentgrößen sind links angegeben.

Das mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und XhoI behandelte DNA-Fragment wurde anschließend gereinigt, in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert und nach Ligation in *E. coli* JM109 transformiert (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.2). Nach Selektion der Transformanten auf LB-Selektivagar mit Ampicillin, wurden Übernachtskulturen angeimpft, die Plasmide isoliert und diese mittels Restriktionsanalyse mit den Enzymen BamHI und XhoI auf inserierte DNA untersucht. Insert tragende Plasmide wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit den ursprünglichen Sequenzen des BICRASP-3-Gens verglichen, um Mutationen während der Umklonierung auszuschließen. Anschließend wurde das BICRASP-3 Protein in *E. coli* JM109-Zellen als GST-Fusionsprotein hergestellt,

anschließend aufgereinigt und aufkonzentriert (s. Methoden, Kapitel 2.2.1.10). Um zu bestätigen, dass das an GST fusionierte BICRASP-3-Protein die Fähigkeit besitzt, Faktor H zu binden, wurde eine Ligandenaffinitätsblotanalyse durchgeführt (s. Kapitel 3.4.1, Abb. 3.15).

3.4 Charakterisierung des Bindungsverhaltens von BICRASP-3

3.4.1 Analyse der Interaktion von BICRASP-3 mit Proteinen der Faktor H-Proteinfamilie

Im Folgenden sollte die Interaktion von BICRASP-3 mit verschiedenen Proteinen der Faktor H-Familie untersucht werden. Hierzu wurde eine Ligandenaffinitätsblotanalyse mit NHS als Quelle für Faktor H, FHL-1 und FHR-1 durchgeführt. Dabei wurde das Bindungsverhalten von BICRASP-3 mit dem von BbCRASP-1, BbCRASP-2 und BbCRASP-3 von *B. burgdorferi* verglichen.

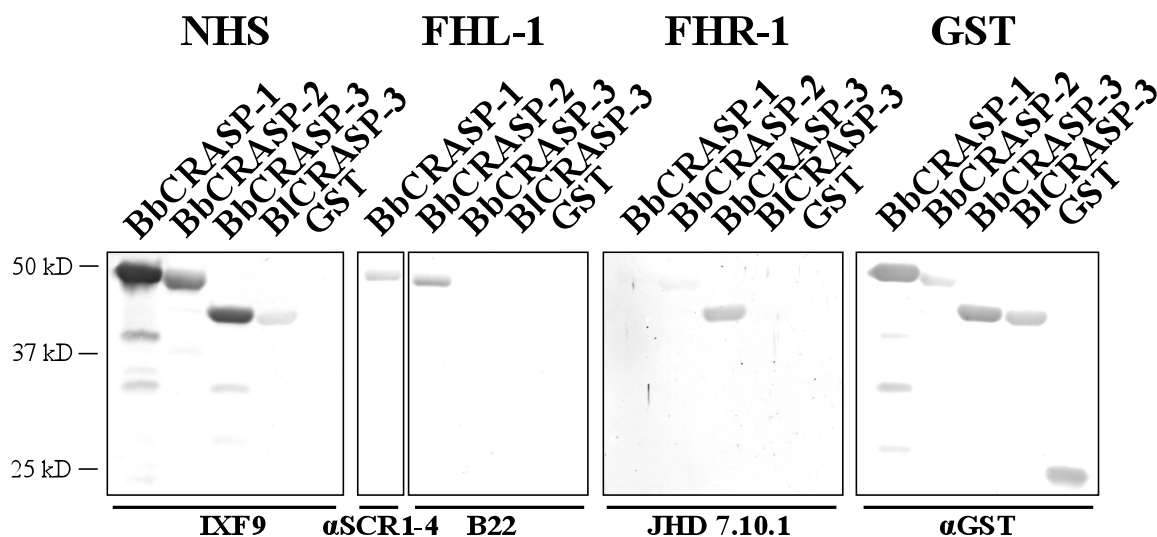


Abb. 3.15, Bindung von Faktor H, FHL-1 und FHR-1 an verschiedene CRASP-Proteine. Die in der Abbildung aufgeführten GST-Fusionsproteine (500 ng) wurden in einem 10 % Tris/Tricin-SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde eine Ligandenaffinitätsblotanalyse mit NHS als Quelle für Faktor H und Kulturüberständen von FHL-1 bzw. FHR-1 durchgeführt. Faktor H wurde mit dem monoklonalen anti-Faktor H-Antikörper IXF9 (Prodinger et al., 1998) detektiert, FHL-1 mit dem polyklonalen anti-SCR1-4 bzw. dem monoklonalen anti-Faktor H/FHL-1-Antikörper B22, sowie FHR-1 mit dem monoklonalen anti-FHR-1-Antikörper JHD 7.10.1. Ein Westernblot mit einem polyklonalen anti-GST-Antikörper erfolgte als Kontrolle. Links angegeben ist das Molekulargewicht des Proteingrößenstandards (Precision Plus Protein Standards, Fa. BioRad).

Wie in Abb. 3.15 zu erkennen, war BICRASP-3 in der Lage, Faktor H zu binden. Gleichzeitig war weder eine Bindung von FHL-1, noch von FHR-1 an BICRASP-3 nachweisbar. Das BbCRASP-3-Protein war in der Lage, Faktor H und FHR-1 zu binden. BbCRASP-1 sowie BbCRASP-2 zeigten eine Interaktion mit Faktor H und FHL-1. Hierbei war die Bindung von

FHL-1 an BbCRASP-1 nicht mit dem monoklonalen anti-SCR5-Antikörper B22 detektierbar, da BbCRASP-1 an die gleiche Domäne des Faktor H-Moleküls bindet wie B22 und so dessen Bindungsstelle blockiert. Die Bindung von FHL-1 wurde deshalb in diesem Fall mit einem polyklonalen Antiserum gegen SCR1-4 detektiert. Bei der Detektion von GST und NHS traten teilweise multiple, schwache Banden auf, die auf Degradierungsprodukte der in vitro instabilen CRASP-Fusionsproteine zurückzuführen sind.

Um die Interaktion von Faktor H mit BICRASP-3 detaillierter zu untersuchen, wurde ein ELISA (s. Methoden, Kapitel 2.2.1.12) durchgeführt. Für diese semiquantitative Methode wurde BICRASP-3, sowie BbCRASP-1, BbCRASP-2 und BbCRASP-3 auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und das Bindungsverhalten dieser Proteine an gereinigtem Faktor H gemessen.

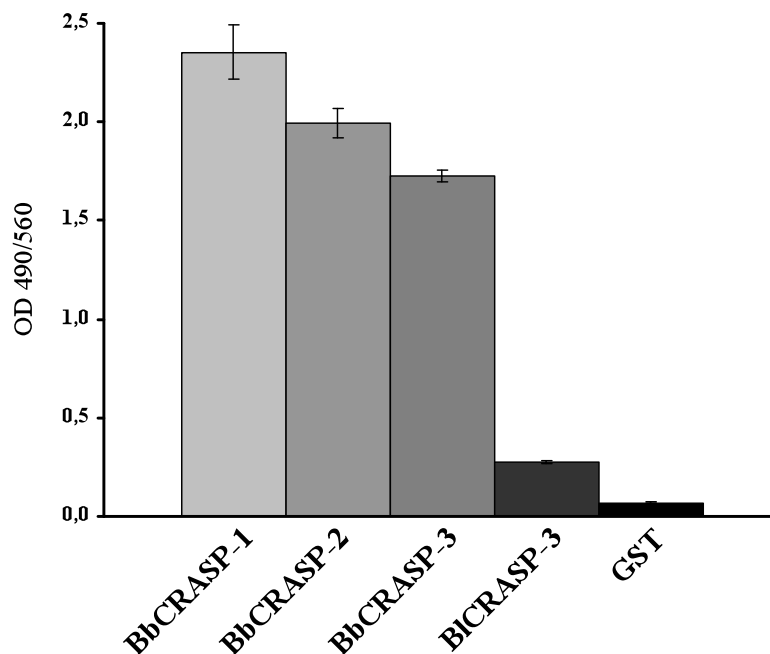


Abb. 3.16, Bindungsverhalten von Faktor H an verschiedene CRASP-Proteine. Gereinigte GST-Fusionsproteine (500 ng) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die Bindung von Faktor H wurde mittels ELISA analysiert. Für die Detektion von Faktor H wurde ein polyklonaler anti-Faktor H-Antikörper verwendet. Die Extinktionswerte wurden bei 490/560 nm bestimmt. BbCRASP-1, BbCRASP-2 und BbCRASP-3 dienten als Vergleich zu BICRASP-3, GST als Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Extinktionswerte von 3 parallelen Versuchsansätzen mit der entsprechenden Standardabweichung. Das Experiment wurde an 3 verschiedenen Tagen wiederholt und ähnliche Ergebnisse erzielt.

Wie Abb. 3.16 zu entnehmen, bestätigt der ELISA, dass BICRASP-3 ein Faktor H-bindendes Protein darstellt. BICRASP-3 besaß im Verhältnis zu dem gleichzeitig untersuchten CRASP-Protein von *B. burgdorferi* eine Bindungsaffinität von ca. 40 %. Demgegenüber zeigte BbCRASP-3 eine Bindungsaffinität von ca. 78 % und BbCRASP-2 von ca. 84 %. Die zuvor mit BICRASP-3 durchgeführten Ligandenaffinitätsblotanalysen (s. Abb. 3.15) hatten für die

Faktor H-Bindung stets ein sehr schwaches Signal ergeben, im Vergleich mit den CRASP-Proteinen von *B. burgdorferi*. Das mittels ELISA ermittelte Bindungsverhalten spiegelt diese Ergebnisse wider und bestätigt, dass BICRASP-3 an Faktor H bindet, jedoch signifikant schwächer als die anderen untersuchten CRASP-Proteine.

3.4.2 Untersuchung der Kofaktoraktivität von an gereinigtem BICRASP-3 gebundenem Faktor H

Die Analyse des Bindungsverhaltens mittels ELISA bestätigte, dass BICRASP-3 Faktor H schwach bindet. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, ob das an BICRASP-3 gebundene Faktor H-Molekül Kofaktoraktivität besitzt. Hierzu wurde BICRASP-3 auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit Faktor H sowie, nach gründlichem Waschen, mit Faktor I und C3b inkubiert (s. Methoden, Kapitel 2.2.1.13). Der Überstand dieser Reaktion wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Spaltprodukte von C3b mittels Westernblot nachgewiesen.

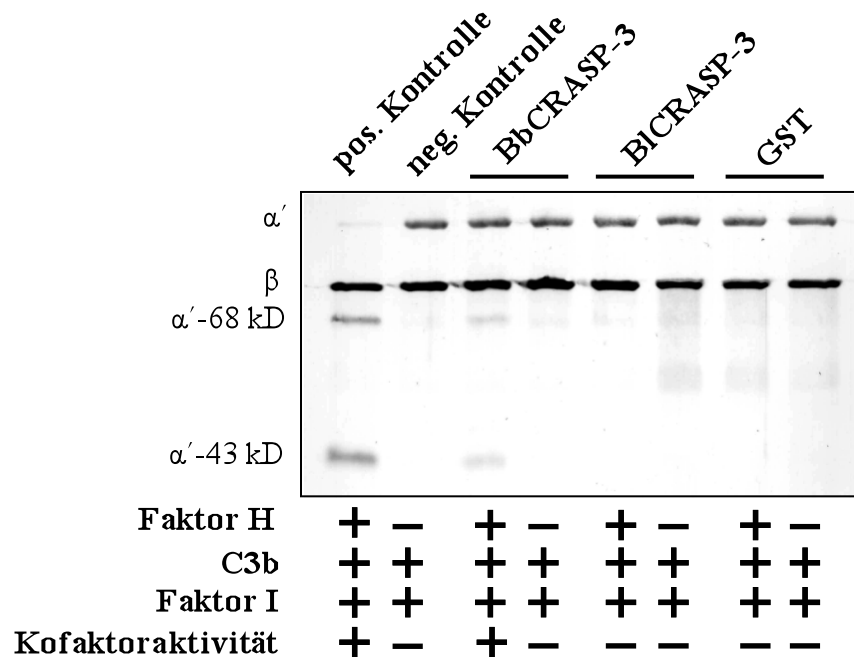


Abb. 3.17, Nachweis der Kofaktoraktivität von an gereinigtem BICRASP-3 gebundenen Faktor H. BICRASP-3 und BbCRASP-3 (500 ng) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und bei Zimmertemperatur 6 h mit 500 ng Faktor H inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden Faktor I und C3b im Überschuss hinzugegeben und 15 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Überstand der Reaktion wurde mittels SDS-PAGE im 12,5 % Laemmli-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Spaltprodukte von C3b mit einem polyklonalen anti-C3-Antikörper detektiert. Als Positivkontrollen diente zum einen BbCRASP-3, zum anderen wurden Faktor H, Faktor I und C3b unter identischen Bedingungen inkubiert. GST diente als Negativkontrolle. Links gekennzeichnet sind die Spaltprodukte von C3b.

Wie in Abb. 3.17 dargestellt, sind bei BbCRASP-3 die typischen Fragmente von inaktiviertem C3b, nämlich die α' -68 kD-, α' -46 kD- und α' -43 kD-Bande, zu erkennen, während bei BICRASP-3, ebenso wie bei GST nur die α' - und β -Ketten des Proteins nachweisbar waren. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass (1) Faktor H in einer Konfiguration an BICRASP-3 bindet, bei der die komplementregulatorischen Domänen blockiert werden, oder (2) dass aufgrund der schwachen Interaktion von BICRASP-3 und Faktor H die Nachweisgrenze des Westernblots, potentiell entstandene Spaltprodukte zu detektieren, zu gering ist. Die mit gereinigtem BICRASP-3 durchgeführten Untersuchungen bestätigen außerdem die Ergebnisse des Kofaktor-Assays mit ganzen *B. lusitaniae* Zellen (s. Kapitel 3.2.3).

3.4.3 Lokalisierung der mit BICRASP-3 interagierenden SCR-Domäne von Faktor H

Alle Faktor H-bindenden Erp-orthologen Proteine von *B. burgdorferi*, BbCRASP-3, -4 und -5, binden Faktor H im Bereich der C-terminalen SCR-Domänen 19-20 (Kraicz et al., 2003). In dieser Bindungskonfiguration besitzt Faktor H Kofaktoraktivität. Dem gegenüber ist an BICRASP-3 gebundener Faktor H nicht komplementregulatorisch aktiv (s. Kapitel 3.4.2). Da die komplementregulatorische Funktion von Faktor H in den N-terminalen SCRs 1-4 lokalisiert ist (Józsi und Zipfel, 2008), sollte untersucht werden, welche SCRs von Faktor H an der Bindung von BICRASP-3 beteiligt sind. Dazu wurde eine Ligandenaffinitätsblotanalyse von BICRASP-3 mit verschiedenen Deletionsmutanten von Faktor H sowie FHL-1 und FHR-1 durchgeführt.

Wie in Abb. 3.18 dargestellt, war für BICRASP-3 ausschließlich eine Bindung der C-terminalen SCRs von Faktor H nachweisbar. Es erfolgte weder eine Bindung der N-terminalen SCR-Domänen 1-6, noch von FHL-1 oder FHR-1 an BICRASP-3.

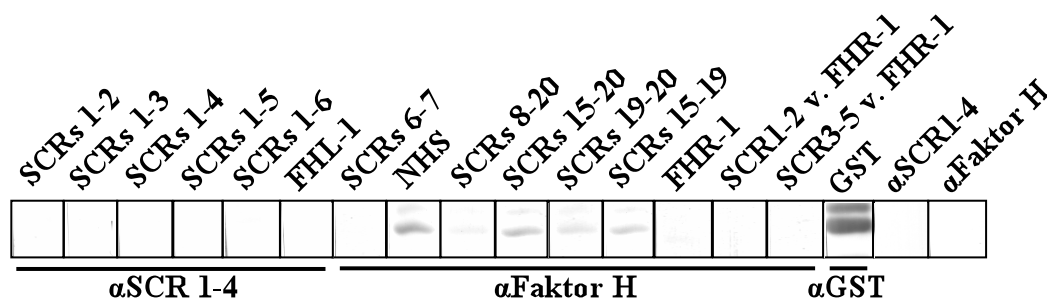


Abb. 3.18, Lokalisierung der Interaktionsdomäne zwischen BICRASP-3 und Faktor H. Gereinigtes GST-BICRASP-3 (500 ng) wurde in einem 10 % Tris/Tricin-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Membranstreifen wurden anschließend mit verschiedenen Deletionsmutanten von Faktor H bzw. FHR-1, mit FHL-1 oder mit NHS inkubiert und mit dem anti-SCR1-4-Antikörper bzw. einem polyklonalen anti-Faktor H-Antikörper detektiert. Zusätzlich wurde GST-BICRASP-3 mittels Westernblot durch einen anti-GST-Antikörper detektiert. Als Negativkontrollen dienten Membranstreifen, die nur mit den betreffenden Antikörpern inkubiert wurden.

3.4.4 Lokalisation von BICRASP-3 auf der Zelloberfläche von *B. lusitaniae*

Mittels Serumadsorptionstest konnte gezeigt werden, dass *B. lusitaniae*-Stämme Faktor H sowie FHR-1 und FHR-2 binden können (s. Kapitel 3.2.2). Insbesondere bei *B. lusitaniae* MT-M8 konnte mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse ein ca. 16 kD-Protein, BICRASP-3, nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.2.1). Damit BICRASP-3 in vivo mit Faktor H interagieren kann, muss es auf der Zelloberfläche der Spirochäten lokalisiert sein. Um der Frage nachzugehen, ob BICRASP-3 ein membranständiges Protein darstellt, wurden je 4×10^8 Zellen von *B. lusitaniae* MT-M8 mit steigenden Konzentrationen von Proteinase K bzw. Trypsin inkubiert. Die proteolytische Wirkung der Enzyme wurde indirekt mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse über die Bindung von Faktor H an BICRASP-3 nachgewiesen (s. Abb. 3.19).

Bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 2,5 µg/ml der unspezifischen Proteinase K konnte keine Bindung von Faktor H an BICRASP-3 detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich BICRASP-3 gegenüber der spezifischen Protease Trypsin als resistent. Selbst bei der höchsten Konzentration von 20 µg/ml Trypsin blieb die Intensität des Signals unverändert. Gleichzeitig wurde mittels Westernblot das in der Borrelienzelle periplasmatisch lokalisierte Flagellin detektiert. Die Unversehrtheit von Flagellin diente dem Nachweis, dass die Borrelienmembran während des Versuchs intakt geblieben war und weder Flagellin aus der Zelle noch die Proteasen in den periplasmatischen Raum gelangen konnten. Außerdem lässt sich zeigen, dass ähnliche Mengen an Zelllysaten aufgetragen wurden. Das Ergebnis dieses Versuchs lässt vermuten, dass BICRASP-3 ein an der Borrelienoberfläche lokalisiertes Protein von *B. lusitaniae* darstellt.

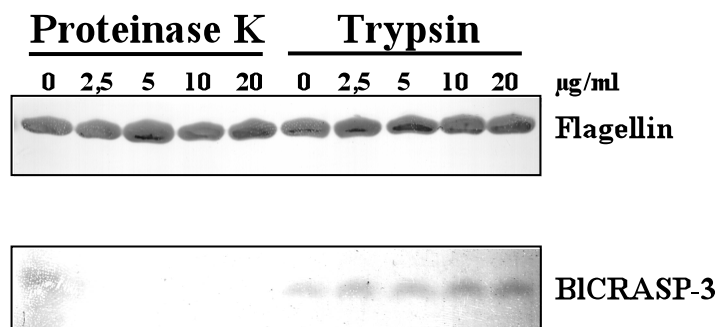


Abb. 3.19, Nachweis der Membranständigkeit des BICRASP-3 Proteins von *B. lusitaniae* MT-M8. 4×10^8 Zellen von *B. lusitaniae* MT-M8 wurden für 2 h bei 21°C mit steigenden Konzentrationen von Proteinase K oder Trypsin inkubiert. Nach Zugabe von Proteaseinhibitoren wurden die Borrelien mittels Ultraschall lysiert und die Zelllysate mittels Tris/Tricin-SDS-PAGE separiert. Für die Ligandenaffinitätsblotanalyse diente NHS als Quelle für Faktor H. Die Detektion von Faktor H erfolgte mit einem polyklonalen anti-Faktor H-Antikörper und der Nachweis von Flagellin mit dem monoklonalen anti-Flagellin-Antikörper L41 1C11. Die Detektion von Flagellin erfolgte als Nachweis der Unversehrtheit der Borrelienmembran während des Versuchs und gleichzeitig als Äquivalenzkontrolle der aufgetragenen Lysatmenge.

3.5 Identifizierung *erp*-orthologer Gensequenzen bei verschiedenen *B. lusitaniae*-Isolaten

3.5.1 Amplifikation und Identifikation BICRASP-3-orthologer Gensequenzen von *B. lusitaniae*

Auf Grund der durchgeführten Studien konnte das Faktor H-bindende BICRASP-3-Protein bei *B. lusitaniae*-Isolat MT-M8 nachgewiesen werden. Die Analyse der Gensequenz zeigte, dass es sich um ein *erp*-homologes Gen mit naher Verwandtschaft zu *erpA* (BbCRASP-5), *erpC* (BbCRASP-4) und *erpP* (BbCRASP-3) von *B. burgdorferi* B31 handelte (s. Kapitel 3.3.3). Nachfolgend sollte untersucht werden, ob andere *B. lusitaniae*-Isolate ebenfalls orthologe Gensequenzen besitzen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde mit den spezifischen Oligonukleotiden für das BICRASP-3 (MT-M8) kodierende Gen (s. Material, Kapitel 2.1.8) eine PCR mit Ganzzelllysate der 16 *B. lusitaniae*-Stämme durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionen mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

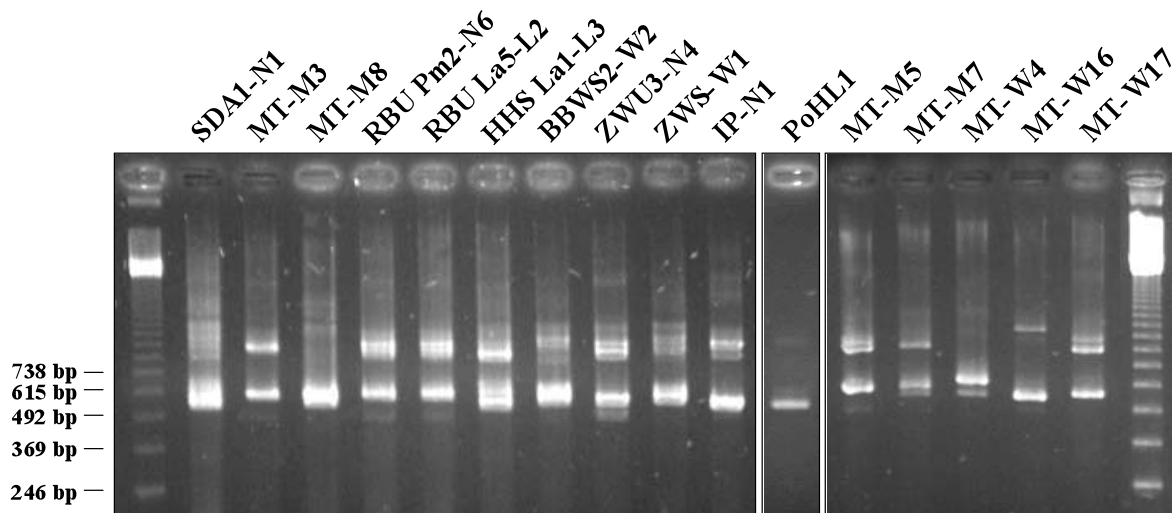


Abb. 3.20, Amplifikation orthologer Gensequenzen des BICRASP-3 (MT-M8) kodierenden Gens bei verschiedenen *B. lusitaniae*-Isolaten mittels PCR. Als Ausgangsmaterial dienten Ganzzelllysate verschiedener *B. lusitaniae*-Isolate. Die Amplifikation erfolgte mittels PCR mit den Primern BICRASP-3 ss (+) BamHI und BICRASP-3 3' nc (-) Xho. Die Reaktionen wurden anschließend in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Auf den beiden äußeren Spuren wurde der 123 bp DNA-Marker (Fa. Invitrogen) aufgetragen, die Fragmentgrößen sind links angegeben.

Wie in Abb. 3.20 zu erkennen, lieferte die PCR von allen *B. lusitaniae*-Isolaten außer von den Stämmen MT-M3, MT-M8 und MT-W16 multiple Amplifikate. Bei den Stämmen MT-M3 und MT-W16 liessen sich zwei DNA-Amplifikate generieren. Durch Erhöhung der Anlagerungstemperatur von 50°C auf 55°C bzw. 60°C, wurde in einer erneuten PCR versucht, die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Die Analyse der PCR ergab jedoch bei einer

Anlagerungstemperatur von 55°C keine Veränderung im Bandenspektrum, während man bei einer Anlagerungstemperatur von 60°C keine Amplifikate erhielt.

Um die Ursache für diese unspezifische Reaktion zu untersuchen, wurden die PCR-Amplifikate der Stämme MT-M3, RBU Pm2-N6 und RBU La5-L2 gereinigt, in den Vektor pCR2.1 TOPO (s. Material, Kapitel 2.1.9) kloniert und die Ligationsreaktion in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.2). Mehrere Klone wurden über Blau/Weiß-Selektion auf Ampicillin-haltigen Agarplatten selektioniert, vermehrt und die Plasmide isoliert. Diese wurden anschließend mittels Restriktionsanalyse auf inserierte DNA untersucht. Hierzu wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym EcoRI hydrolysiert und die Reaktionen mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Wie erwartet, enthielten die untersuchten Plasmide Inserts unterschiedlicher Größe. Plasmide mit inserierter DNA verschiedener Länge wurden sequenziert.

3.5.2 Analyse *erp*-orthologer Gensequenzen bei *B. lusitaniae*-Isolaten

Mittels des in Abb. 3.21 dargestellten Sequenzvergleich konnte nachgewiesen werden, dass die Plasmide mit den ca. 600 bp-langen inserierten DNA-Fragmenten der Stämme MT-M3 und RBU La5-L2 homologe Sequenzen zu BICRASP-3 von MT-M8 aufwiesen.

B1CRASP-3 (MT-M8)	MNKKMFIICALFVLIS	SCKTDESL	SEQESLSKQD	SLSKQD	SLSKQGRSYTIKFSEFSVK
B1CRASP-3 (MT-M3)	-----FVLIS	GSKTDESL	SEQGGLSE	QGLSKONS	LSKQGRRYAIKISEFSVK
B1CRASP-3 (RBU La5-L2)	-----FVLIS	GSKTDESL	SEQGGLSE	QDLSKYN	SLSKTGRRYAIKISEFSVK
B1CRASP-3 (MT-M8)	IKNKDSNNNSWKDL	GTLLIKKEEG	KEGLILVGL	NNYQGGGHS	ATFFLLEPSEVNNFLKA
B1CRASP-3 (MT-M3)	IKNKDANS-SWKDL	GTLLMQKEK	NEGLILVGL	NNYQGGGHN	ATFFLLEPSEINNFLKA
B1CRASP-3 (RBU La5-L2)	IKNKDANS-SWKDL	GTLLMQKEEG	KEGLILVGL	VKDAVRG	GHNATFFLLEPSEINNFLKA
B1CRASP-3 (MT-M8)	MTKGGSFETGMYYGK	DEESVRNGIK	NKKIITKIE	KINGSQHIT	FLGDKIKGSPGSTAKY
B1CRASP-3 (MT-M3)	MIKGGSFKTGMYGYR	DEESVINGIK	HKHEIITKIE	TINGAQHIT	FSGDKIKDSRGRNAEY
B1CRASP-3 (RBU La5-L2)	MIKGGSFKTGMYGYR	DEESVINGIK	HKHEIITKIE	TINGSQHIT	FSGDKIKDSPNRATAY
B1CRASP-3 (MT-M8)	AIPLEEFKKNLK				
B1CRASP-3 (MT-M3)	AIPLEEFKKNLK				
B1CRASP-3 (RBU La5-L2)	AIPLEEFKKNLK				

Abb. 3.21, Homologievergleich der Aminosäuresequenz verschiedener BICRASP-3-orthologer Proteine von *B. lusitaniae*. Für den Sequenzvergleich wurde die Jotun Hein-Methode mit dem Programm MegAlign 4.0 verwendet.

Parallel dazu wurden die Plasmide, die die 800 bp-langen DNA-Fragmente enthielten sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wiesen deutliche Unterschiede zu dem BICRASP-3 kodierenden Gen auf, so dass ein Datenbankabgleich mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) durchgeführt wurde. Interessanterweise ergab sich eine deutliche Zuordnung zur *erp*-Genfamilie, wobei die höchsten Übereinstimmungen der abgeleiteten

Aminosäuresequenz für *B. burgdorferi* ErpL bzw. ErpY gefunden wurde. Die Proteine wurden entsprechend der Homologie des betreffenden Erp-Proteins und dem *B. lusitaniae*-Ursprungstamm benannt und durchnummeriert. Somit steht z.B. die Bezeichnung ErpL/Y1 (MT-M3) für die aus *B. lusitaniae* MT-M3 stammende DNA-Sequenz, welche für ein ErpL/Y homologes Protein kodiert. Ein Homologievergleich der erhaltenen Aminosäuresequenzen mit ErpL und ErpY von *B. burgdorferi* B31 wurde mit dem MegAlign 4.0 Modul des Programms DNASTAR durchgeführt (s. Abb. 3.22) und anhand dessen ein Stammbaum generiert (s. Abb. 3.23).

ErpL (B31)	MNK-----KMKMFIICAVFALMISCKNYASGENLKN----SEQNLE
ErpY (B31)	MNK-----KMKMFIICAFMLISSCKNDVTSKDLEG----AVKDLE
ErpL/Y1 (MT-M3)	GSKTDESKEAKSLDNILDDIGLEVEKLVQADGAQEAGNKAGGAGAGGGG----AGGAGA
ErpL/Y1 (RBU Pm2-N6)	GSKTDESKEEKSLENLLDDIGLEVEKLVQADEAPKQAGNKAGGAGAGAGGVPGAVGAVAA
ErpL/Y2 (RBU Pm2-N6)	GSKTDESKEESLENLLDDIGLEVGLVQANEAQKQVGNKAAGAIAGAVA----VAGGAG
ErpL (B31)	SSEQNVKKTEQEIKK--OVEGFLEILETKDLSK---L---DEKDTKETEKQIQELKNKI
ErpY (B31)	SSEQNVKKTEQEIKK--OVEGFLEILETKDLNT---L---DTKETEKQIQELKNKI
ErpL/Y1 (MT-M3)	GAAGAGAGGAGGGGAGGGGDCGAGGVPGAGGVPG---AGGAG---GADNIKERIEKLKKKI
ErpL/Y1 (RBU Pm2-N6)	GGVGGAIAAGAVPGAGAVPGAGAVPGGAVAAGGVGAAG---AVDNIKEKIEELKKKI
ErpL/Y2 (RBU Pm2-N6)	AGAVAVAGGAGA-----GAVAVAGGAGAAG---G-----AVDNIKKIAELKAKI
ErpL (B31)	EKLDSKKTISIETYSYEYEKINKIKIEKL-K---GKG---LEDKFKLEESLAKKKGERK
ErpY (B31)	EKLDSKKTISIETYSYEYEKINKIKIEKL-K---GKG---LEDKLNELSESLKKKKKERK
ErpL/Y1 (MT-M3)	NQANSQNTSIGKYRTYEEVKKLRKEL-K---GNGNGGNEKELKALDES�TKKESRK
ErpL/Y1 (RBU Pm2-N6)	EKVDPKNTSLGTYRKYEVEVKKLRKEL-KKNGNGNGGNGNSEAELRALESSTKKKESRK
ErpL/Y2 (RBU Pm2-N6)	DKANSKKTISIGTYSTYEEVKKIRBELQK---GNENSGNSEKELKELESSTKIKKGARK
ErpL (B31)	KALQEAQOKFEEYKQVDISTGKTQGDRSKNRGGVGVQAWQCANELGLGVSYSN--GGSD
ErpY (B31)	KALQEAQKKFEEYKQAESATGVTHGSOVQROGGVGLQAWQCANSGLF-----K--NMTS
ErpL/Y1 (MT-M3)	KSLEESKKNKFEGFKROVAAATGRITYGHRVQNRPIGAQAALYAQQLGL-----NVKIDNN
ErpL/Y1 (RBU Pm2-N6)	KELEEFKKNKFEGFKTOVDATTGVTDCGHRVQNRPIGAQAALQYAKALGL-----NVNIDKD
ErpL/Y2 (RBU Pm2-N6)	KELEDSKKNKFEGFKTVAAATGRTQGDQTRNSGQIGLQASQYAKALGL-----RIDTSKN
ErpL (B31)	NSNTDELANKVIDDSLKKIEEELKGLIEE---DKKE
ErpY (B31)	GNNTSDMTNEVITNSLKKIEEELKNLGETVEGKKE
ErpL/Y1 (MT-M3)	SNNTKELVNOVIDGALKKIAEELK-----E
ErpL/Y1 (RBU Pm2-N6)	SNDTKKLVNOVIDGALKKIAEELK-----KE
ErpL/Y2 (RBU Pm2-N6)	SSDTGKLVSHIIEEAIKKIEEELK-----KE

Abb. 3.22, Homologievergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Erp-orthologer Proteine von *B. lusitaniae*. Für den Sequenzvergleich wurde die Jotun Hein-Methode mit dem Programm MegAlign 4.0 verwendet. Die Aminosäuresequenz von ErpL (B31) diene als Referenzsequenz. Die Sequenzen der Vergleichsproteine ErpL (Stamm *B. burgdorferi* B31) (Nr. NP 051372) und ErpY (Stamm *B. burgdorferi* B31) (Nr. NP 051288) wurden der Genbank entnommen.

Aus dem Sequenzvergleich der unterschiedlichen DNA-Fragmente und den im Stammbaum dargestellten Proteinverwandtschaften nach der Jotun Hein-Methode, war es möglich, die ErpL- bzw. ErpY-homologen Proteine in drei Gruppen einzuteilen. Dabei bildeten ErpL/Y1 (RBU Pm2-N6) und ErpL/Y1 (RBU La5-L2), sowie ErpL/Y2 (RBU Pm2-N6) und ErpL/Y2 (RBU La5-L2), welche jeweils miteinander zu 100 % identisch waren eine Gruppe. ErpL/Y1

(MT-M3) war mit den oben genannten Gruppen zu 71,1% bzw. 60,3 % identisch und bildete somit eine eigenständige Gruppe.

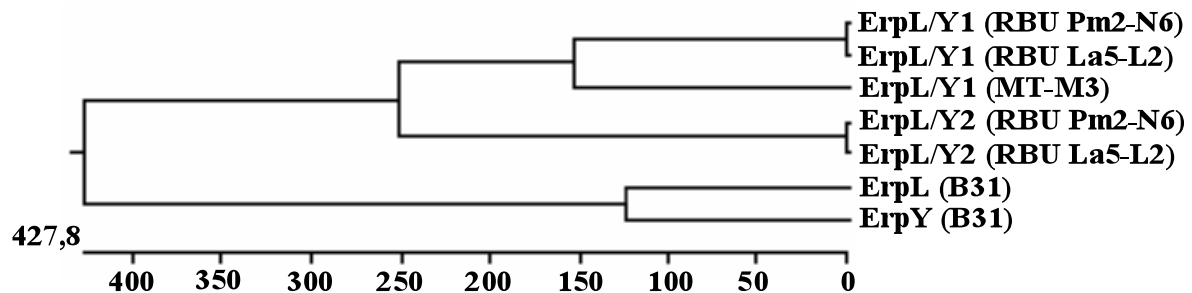


Abb. 3.23, Phylogenetischer Stammbaum verschiedener ErpL/Y-orthologer Proteine von *B. lusitaniae*. Der Stammbaum der aufgeführten Erp-Proteine wurde anhand des Homologievergleichs in Abb. 3.22 mit dem MegAlign 4.0 Modul des Programms DNASTAR erstellt.

Zusammenfassend kann auf Grund dieser Ergebnisse festgestellt werden, dass bei dem portugiesischen Isolat MT-M3, sowie dem süddeutschen Isolat RBU La5-L2 homologe Sequenzen zu dem BICRASP-3 kodierenden Gen von MT-M8 nachgewiesen werden konnten. Gleichzeitig wurden innerhalb der süddeutschen Isolate RBU Pm2-N6 und RBU La5-L2 zwei *erpL*- bzw. *erpY*-homologe Sequenzen identifiziert, welche sich interessanterweise aufgrund ihrer Homologie mit den gleichen Oligonukleotiden amplifizieren ließen. Das portugiesische Isolat MT-M3 besaß eine zusätzliche *erpL/Y*-homologe Gensequenz, welche sich von denen der süddeutschen Isolate unterschied.

3.6 Identifizierung BICRASP-3-orthologer Gensequenzen innerhalb der Genospezies *B. lusitaniae*

3.6.1 Genotypische Analyse des Plasmidprofils von *B. lusitaniae*-Isolaten

Die Lyme-Borrelien können neben dem linearen Chromosom bis zu 24 verschiedene lineare (lp) oder zirkuläre (cp) Plasmide enthalten. Insgesamt zeigt sich eine deutliche Heterogenität in der Anzahl und Größe von Plasmiden zwischen den einzelnen Genospezies, aber auch zwischen den einzelnen Isolaten. Daher stellte sich grundsätzlich die Frage, wie ausgeprägt die Heterogenität der Plasmidmuster der einzelnen *B. lusitaniae*-Isolate ist.

Für die Analyse des Plasmidprofils von *B. lusitaniae* wurde die extrachromosomale DNA von 16 *B. lusitaniae*-Isolaten sowie von *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* FEM1-D15 und *B. garinii* G1 isoliert (s. Methoden, Kapitel 2.2.3.8) und anschließend mittels Pulsfeldgelelektrophorese (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.7) im 1 % Agarosegel aufgetrennt (s. Abb. 3.24). Die

Plasmidgrößen wurden mit Hilfe des Programms Quantity One 4.0 ermittelt und sind in Tab. 3.1 dargestellt.

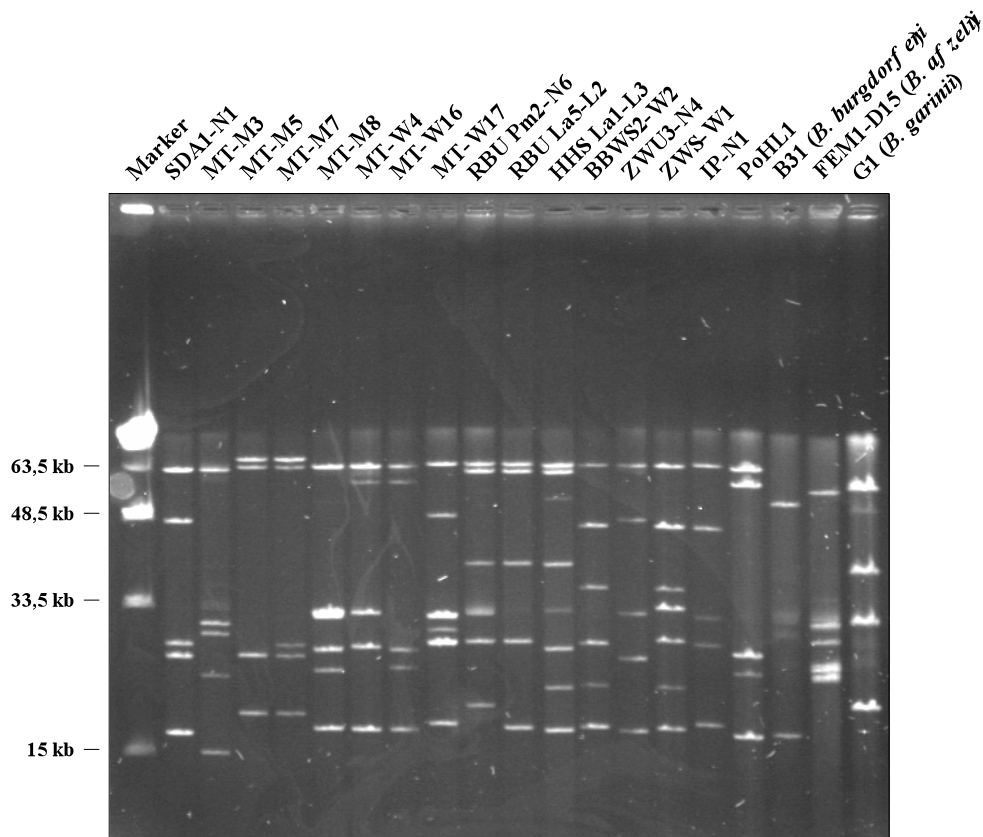


Abb. 3.24, Analyse des Plasmidprofils von *B. lusitaniae*. Die extrachromosomale DNA verschiedener *B. lusitaniae*-Stämme sowie der Vergleichsstämme *B. burgdorferi* B31-e2, *B. afzelii* FEM1-D15 und *B. garinii* G1, wurde isoliert und 200 ng DNA in einem 1 % Agarosegel mittels PFGE separiert. Links angegeben sind die Größen des Midrange PFGE-MarkerI (Fa. New England Biolabs).

Die verschiedenen *B. lusitaniae*-Isolate wiesen ein sehr heterogenes Plasmidmuster mit nur wenigen Gemeinsamkeiten auf. Plasmide mit einer ungefähren Größe von ca. 60-61 kb kamen bei allen *B. lusitaniae*-Isolaten vor sowie mit 15-19 kb relativ kleine Plasmide. Plasmide mit einer Größe von ca. 32 kb, lagen bei den Isolaten MT-M8, MT-W4, MT-W17, RBU Pm2-N6, HHS La1-L3, ZWU3-N4, IP-N1 und ZWS-W1 vor. Deutliche Ähnlichkeiten bezüglich mehrerer Plasmide zeigten nur die 3 süddeutschen Isolate RBU Pm2-N6, RBU La5-L2 und HHS La1-L3. Gleichzeitig waren keine Ähnlichkeiten mit den Vergleichsstämmen *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* Fem1-D15 und *B. garinii* G1 festzustellen. Bei *B. burgdorferi* B31 konnten bei dieser Untersuchung Plasmide nachgewiesen werden, welche in ihrer Größe mit den bereits in der Literatur beschriebenen Plasmiden (Casjens, 2001) vergleichbar waren.

Genospezies	Stamm	Plasmidgrößen [kb]
<i>B. lusitaniae</i>	SDA-N1	60 , 46 , 26, 24 , 16
	MT-M3	60, 29, 27 , 22, 15
	MT-M5	66, 61 , 25, 18
	MT-M7	66, 61 , 26, 24 , 18
	MT-M8	61 , 30 , 25, 22, 17
	MT-W4	61 , 56 , 31 , 26, 17
	MT-W16	61, 56 , 25, 23, 17
	MT-W17	62, 47 , 30, 28, 26 , 17
	RBU Pm2-N6	62 , 60, 39 , 31, 26, 19
	RBU La5-L2	62 , 60, 38 , 26, 17
	HHS La1-L3	61 , 60, 38 , 31, 25, 20, 16
	BBWS2-W2	61, 45 , 35 , 26, 21, 17
	ZWU3-N4	61, 46 , 30, 24, 16
	ZWS-W1	61, 44 , 34 , 31, 26, 20, 17
	IP-N1	61, 44 , 31, 30, 17
	PoHL1	60 , 55, 24, 22, 16
<i>B. burgdorferi</i>	B31-e2	49, 30, 28, 16
<i>B. afzelii</i>	FEM1-D15	53, 29, 26, 23, 22
<i>B. garinii</i>	G1	56, 38, 30, 19

Tab. 3.1, Ermittelte Plasmidgrößen verschiedener *B. lusitaniae*-Isolate. Angegeben sind die mittels Quantity One 4.0 ermittelten Plasmidgrößen. Plasmide, die bei der Southern Blot-Analyse ein positives Signal für *erp*-homologe Sequenzen lieferten, sind fett hervorgehoben.

3.6.2 Lokalisierung *erp*-homologer Gensequenzen auf den Plasmiden von *B. lusitaniae* mittels Southern Blot-Analyse

Die mono- bzw. bicistronischen *erp*-Loci der gut untersuchten *B. burgdorferi*-Stämme B31, N40, Sh-2-82 und 297 wurden auf den multiplen zirkulären als cp32 bezeichneten Plasmiden lokalisiert (Stevenson et al., 2006). Inwieweit sich *erp*-homologe Sequenzen, insbesondere orthologe BICRASP-3 kodierende Gene im Genom von *B. lusitaniae* lokalisieren lassen, war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Aus diesem Grund wurde eine Southern Blot-Analyse (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.8) durchgeführt. Als Sonde diente die BICRASP-3 kodierende Gensequenz von MT-M8. Mit Hilfe der spezifischen Oligonukleotide BICRASP-3 55(+) BamHI und BICRASP-3 3nc(-) Xho wurde das in den pCR2.1 TOPO-Vektor klonierte Gen amplifiziert und anschließend gereinigt und enzymatisch markiert. Nach erfolgter Hybridisierung und Detektion zeigten sich multiple Signale bei allen *B. lusitaniae*-Stämmen, außer MT-M3, MT-M5, MT-W16, ZWU3-N4 und IP-N1, bei welchen nur ein einzelnes Signal nachweisbar war. Signale, welche eindeutig bestimmten Plasmiden zugeordnet werden konnten, wurden in Tab. 3.1 markiert. Wie vermutet, konnten bei allen Isolaten *erp*-homologe Gensequenzen detektiert werden. Diese waren, dem heterogenen Plasmidmuster von *B. lusitaniae* entsprechend (s. Kapitel 3.6.1), auf verschiedenen Plasmiden lokalisiert. Ähnliche Hybridisierungsmuster zeigten die 3 süddeutschen Isolate RBU Pm2-N6, RBU La5-

L2 und HHS La1-L3, sowie die ebenfalls süddeutschen Zeckenisolate BBWS2-W2 und ZWS-W1 und die portugiesischen Zeckenisolate MT-M8 und MT-W4. Bei den Genospezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* war keine Hybridisierung der BICRASP-3 Sonde mit DNA-Abschnitten nachweisbar, obwohl das BICRASP-3 kodierende Gen zu ca. 61 % mit ErpA, ErpC und ErpP von *B. burgdorferi* B31 identisch ist (s. Kapitel 3.3.3). Dies erklärt sich aufgrund der stringenten Bedingungen bei Durchführung des Southern Blot.

Der Nachweis von homologen Sequenzen auf unterschiedlichen Plasmiden des gleichen *B. lusitaniae* Stammes erklärt, dass bei der PCR mit den gleichen Oligonukleotiden multiple, teilweise nicht scharf abgrenzbare Banden nachweisbar waren. Bei dem Isolat MT-M8, bei welchem nach PCR nur ein Amplifikat entstanden war, konnten anhand der Southern Blot-Analyse zwei Plasmide mit *erp*-homologen Sequenzen nachgewiesen werden.

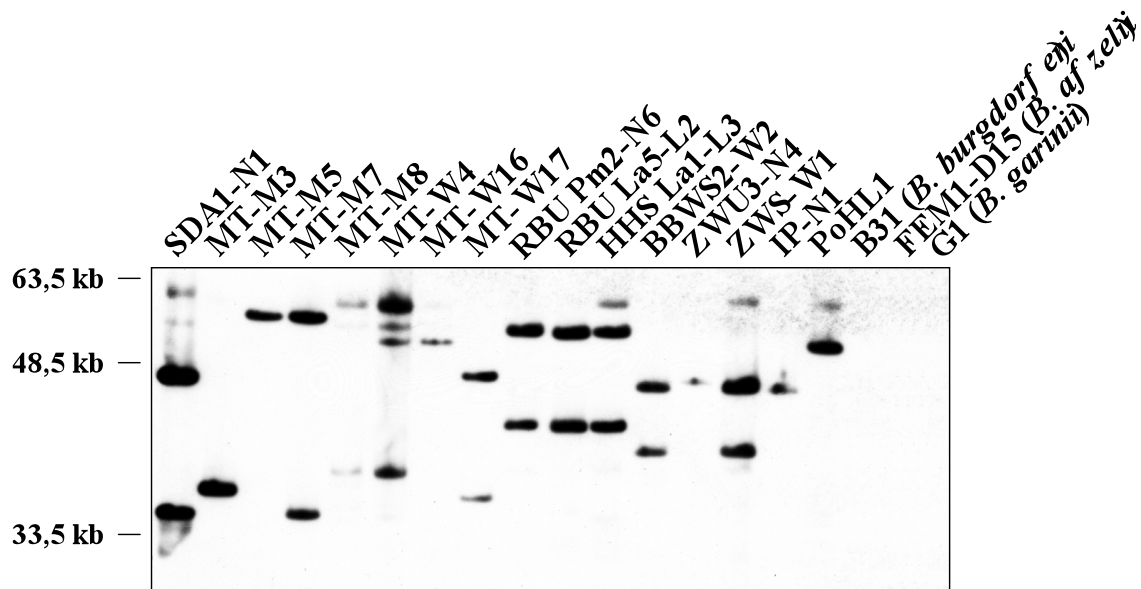


Abb. 3.25, Nachweis *erp*-homologer Gensequenzen bei *B. lusitaniae*. Die extrachromosomale DNA verschiedener *B. lusitaniae*-Stämme wurde isoliert und die Plasmide (200 ng) in einem 1 % Agarosegel mittels PFGE separiert. Die DNA wurde mittels Vakuumtransfer auf eine Nylonmembran überführt. Als Sonde für *erp*-homologe Sequenzen diente die BICRASP-3 kodierende Gensequenz von *B. lusitaniae* MT-M8. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. Nach stringentem Waschen mit Harnstoff-haltigem Waschpuffer (6 M) erfolgte die Detektion des ECL-Films nach 24 h.

Als Kontrolle erfolgte außerdem die Detektion des *ospA*-Gens mittels Southern Blot-Analyse. Da es nicht gelang, mit den Oligonukleotiden OspA1 und OspA2 (s. Material, Kapitel 2.1.8) das *ospA*-Gen von *B. lusitaniae* MT-M8 mittels PCR zu amplifizieren, wurde als Sonde die *ospA*-Gensequenz von *B. burgdorferi* B31-e2 verwendet. Nach Hybridisierung mit der *ospA*-Sonde konnte bei allen Borrelienisolaten ein schwaches Signal auf einem Plasmid von ca. 60 kb detektiert werden. Verglichen mit den bekannten Genloci des *ospA*-Gens bei *B. burgdorferi* (lp54; 54 kb Plasmid), *B. afzelii* (lp54; 56 kb Plasmid) und *B. garinii* (lp54; 60

kb Plasmid) zeigt sich eine deutliche Kongruenz bezüglich der Lokalisation des *ospA*-Gens von *B. lusitaniae* auf einem Plasmid ähnlicher Größe (ca. 60 kb). Das schwache Signal bei der Detektion der *ospA*-Sequenz bei den *B. lusitaniae*-Isolaten im Vergleich zum Kontrollstamm B31 erklärt sich durch die Spezifität der Sonde von *B. burgdorferi* B31 und den damit einhergehenden z. T. erheblichen Sequenzunterschieden im *ospA*-Gen der verschiedenen Genospezies.

4. Diskussion

B. lusitaniae wurde im Jahr 1977 durch Ann le Fleche et al. (Le Fleche et al., 1997) erstmals als eigenständige Genospezies innerhalb des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes beschrieben. Sie ist die überwiegende Borrelienspezies in infizierten Zecken im Mittelmeerraum und die einzige in Portugal und Nordafrika nachgewiesene Art. Seit der Isolierung der Spirochäten aus zwei portugiesischen Patientinnen mit Symptomen der Lyme-Borreliose (da Franca et al., 2005; de Carvalho et al., 2008), ist zu vermuten, dass *B. lusitaniae* humanpathogenes Potential besitzt.

4.1 Vergleichende Analyse des Proteinmusters von *B. lusitaniae*

Frühere Analysen des Proteinmusters verschiedener Lyme-Borrelien-Genospezies ergaben, dass die Proteine Hsp60 und Flagellin bei den drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* hoch konserviert sind und sich in ihrem Molekulargewicht kaum unterscheiden. Außerdem zeigten *B. burgdorferi*-Stämme ein sehr homogenes Expressionsmuster der variableren Proteine OspA, OspB und OspC, während verschiedene *B. garinii*- und *B. afzelii*-Isolate ein eher heterogenes Proteinmuster aufwiesen (Busch et al., 1997; Kraiczy, 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse mit 16 *B. lusitaniae*-Isolaten, welche aus verschiedenen Regionen Portugals und Süddeutschlands stammten, wiesen neben den konservierten Proteinen Hsp60 und Flagellin ein sehr homogenes Proteinmuster auf (s. Ergebnisse, Abb. 3.1). Dabei war eine Unterscheidung bezüglich der geographischen Herkunft der untersuchten *B. lusitaniae*-Isolate nicht möglich. Eine deutliche Variabilität zeigte als einziges Isolat SDA-N1, welches gleichzeitig das einzige untersuchte Isolat der Region Serra da Arrábida in Portugal darstellte. Dagegen zeigten sich weder zwischen den verschiedenen süddeutschen Isolaten merkliche Unterschiede, noch zwischen denen süddeutscher Herkunft und denen der Region Tapada Nacional de Mafra in Portugal. Die Oberflächenproteine OspA und OspC von *B. lusitaniae* differierten dagegen deutlich in ihrer Größe von denen der Vergleichsstämme *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1.

4.2 Vergleichende Untersuchungen zur Serumempfindlichkeit von *B. lusitaniae*

4.2.1 Untersuchung der Serumempfindlichkeit von *B. lusitaniae* mittels Serumbakterizidietest und Nachweis aktivierter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche

Serumresistenz, also die Fähigkeit, der bakteriziden Wirkung von Komplement zu entgehen, ist bei verschiedenen humanpathogenen Mikroorganismen verbreitet. Sie wurde unter anderem für die Bakterienspezies *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* und für Streptokokken beschrieben, ebenso für Viren (z.B. *HIV-1*, West-Nil-Virus), Pilze (z.B. *Candida albicans*, *Aspergillus*) und Parasiten (z.B. *Echinococcus spp.*, Schistosomen) (Bernet et al., 2003; Deng et al., 2003; Diaz et al., 1997; Jarva et al., 2003; Meri et al., 2002a; Meri et al., 2004; Rautemaa et al., 1998; Rautemaa et al., 2001; Vogl et al., 2008).

Auch Vertreter der Gattung *Borrelia* besitzen Mechanismen, welche ihnen einen serumresistenten Phänotyp verleihen. Bereits im Jahr 1988 beschrieben S. M. Kochi und R. C. Johnson, dass sich *B. burgdorferi* gegenüber der bakteriziden Wirkung von NHS resistent verhielt (Kochi und Johnson, 1988). Erste Erkenntnisse über Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber NHS innerhalb der Genospezies *B. burgdorferi* veröffentlichten im Jahr 1992 Brade und Mitarbeiter (Brade et al., 1992). Seither wurden zahlreiche Isolate der vier humanpathogenen Lyme-Borrelienspezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. spielmanii* bezüglich ihrer Eigenschaft, Komplement zu aktivieren und ihrer Serumresistenz charakterisiert.

Isolate der Spezies *B. afzelii* und *B. spielmanii* wurden als überwiegend serumresistent klassifiziert, *B. burgdorferi*-Isolate als überwiegend intermediär-resistent. Ausschließlich *B. garinii*-Isolate zeigten einen serumsensiblen Phänotyp (Alitalo et al., 2001; Breitner-Ruddock et al., 1997; Herzberger et al., 2007; Kraiczy et al., 2000; van Dam et al., 1997).

Gemeinsam war allen Genospezies, dass innerhalb der Art stets eine Heterogenität bezüglich der Serumresistenz nachweisbar war, wobei ausschließlich die Kombinationen aus serumresistenten und intermediär-resistenten Isolaten bzw. serumsensiblen und intermediär-resistenten Isolaten auftraten.

Im Rahmen dieser Studie erfolgten die Untersuchungen zur Serumempfindlichkeit von *B. lusitaniae* an insgesamt 16 Isolaten. Hierunter befanden sich 7 Zeckenisolate aus Süddeutschland und 8 Zeckenisolate sowie ein humanes Hautisolat aus Portugal. Die Klassifizierung der potentiell humanpathogenen Genospezies *B. lusitaniae* bezüglich der

Serumresistenz erfolgte zunächst mittels eines Serumbakterizidietests. Anschließend wurden zur Bestätigung der Ergebnisse ein indirekter Immunfluoreszenztest mit Nachweis der Ablagerung aktivierter Komplementkomponenten C3, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche durchgeführt.

Anhand des Serumbakterizidietests konnten 15 *B. lusitaniae*-Isolate eindeutig als serumsensibel klassifiziert werden. Nur das süddeutsche Zeckenisolat IP-N1 wurde auf Grund seines Wachstumsverhaltens als intermediär-serumresistent eingestuft (s. Ergebnisse, Abb. 3.2). Es ist zu erwähnen, dass sich alle *B. lusitaniae*-Isolate anfänglich in Kultur sehr langsam vermehrten. Es wurde beschrieben, dass der Serumbakterizidietest für langsam wachsende Borrelienstämme eine geringe Aussagekraft besitzt (Kraiczy et al., 2000). Nach Adaptation an das Kulturmedium zeigten die Spirochäten jedoch zunehmend kürzere Generationszeiten, weshalb anhand nachfolgender Untersuchungen die Einteilung von *B. lusitaniae* als überwiegend serumsensible Genospezies nochmals bestätigt werden konnte. Die Klassifizierung der *B. lusitaniae*-Isolate bezüglich der Serumempfindlichkeit wurde im Weiteren nochmals mittels indirektem Immunfluoreszenztest verifiziert. Dies erfolgte durch den Nachweis aktivierter Komplementkomponenten (C3, C6 und C5b-9 (terminaler Membranangriffskomplex)) auf der Zelloberfläche der Spirochäten. Alle untersuchten *B. lusitaniae*-Isolaten zeigten eine gleichmäßige Fluoreszenz, was auf eine homogene Ablagerungen von Komplementkomponenten aller drei Aktivierungsstufen schließen lässt (s. Ergebnisse, Abb. 3.4). Zusätzlich traten mit Komplement beladene Zellen ohne DNA auf. Dieses Phänomen wurde bereits bei serumsensitiven Zellen der Genospezies *B. spielmanii* und *B. garinii* nach Inkubation mit NHS beobachtet. (Herzberger et al., 2007) Diese stellen sog. „cell ghosts“ - leere Zellhüllen dar, die durch die Einwirkung on Komplement entstehen. Auch das Isolat IP-N1, welches im Serumbakterizidietest ein intermediär serumresistentes Wachstumsverhalten gezeigt hatte, war mittels Nachweis von C3, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche eindeutig als serumsensibel zu werten. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Experimente ist derzeit nicht zu erklären.

Nach Inkubation der *B. lusitaniae*-Zellen mit NHS kam es zusätzlich zu einem Motilitätsverlust der Spirochäten sowie zur Bildung sog. Blebs, Zellausstülpungen, welche kondensierte DNA enthalten. Dies war sowohl bereits in der Nativmikroskopie vor Fixierung der Zellen, als auch nach Fixierung mittels DAPI- und Immunfärbung zu erkennen. Eine Abnahme der Motilität, sowie die Bildung von Blebs unter Einwirkung von Komplement wurde bereits in der Literatur als Korrelate des Absterbens der Borrelien beschrieben

(Barbour und Hayes, 1986; van Dam et al., 1997) und stand unter den gegebenen Testbedingungen im Einklang mit der Klassifizierung von *B. lusitaniae* als serumsensible Genospezies.

4.2.2 Grundlegende Studien zur Komplementaktivierung von *B. lusitaniae*

Bereits Kochi und Johnson untersuchten 1988 die Aktivierung des Komplementsystems durch *B. burgdorferi*-Stamm 297 (Kochi und Johnson, 1988) und weitere Untersuchungen mit anderen Borrelienstämmen folgten. Dabei vermuteten Breitner-Ruddock und Mitarbeiter, dass die damals bekannten humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* in der Lage sind, den klassischen Weg in Abwesenheit von Antikörpern zu aktivieren, während nur die serumsensible Genospezies *B. garinii* das Komplementsystem über den alternativen Weg aktiviert (Breitner-Ruddock et al., 1997). Van Dam et al. beschrieben dagegen eine Aktivierung beider Wege durch *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* (van Dam et al., 1997). Inwieweit der Lektin-Weg durch Borrelien aktiviert wird, ist bisher ungeklärt.

Die Aktivierung des Komplementsystems von *B. lusitaniae* wurde in dieser Arbeit anhand eines Opsonisierungstests untersucht, indem nach Inkubation der Borrelienzellen mit NHS bzw. NHS-EGTA oder NHS-EDTA C3-Spaltprodukte analysiert wurden. Nach Opsonisierung der serumsensiblen Genospezies *B. lusitaniae* in antikörperfreiem NHS, in welchem der klassische Weg und der alternative Weg aktiv waren, konnten die 68 kD α' 1-Kette sowie die 43 kD α' 2-Kette nachgewiesen werden. Die α' 1-Kette und die α' 2-Kette, als Bestandteile von iC3b, zeigten somit eine Aktivierung des C3-Moleküls an (Law und Reid, 1995). Wurden *B. lusitaniae*-Zellen in NHS-EGTA inkubiert, kam es ebenfalls zur Aktivierung von C3 mit Nachweis der α' 1-Kette und α' 2-Kette von iC3b. Da EGTA den klassischen Weg inhibiert, spricht dieses Ergebnis dafür, dass *B. lusitaniae* vornehmlich den alternativen Weg aktiviert (s. Ergebnisse, Abb. 3.5). Wie erwartet trat bei Inkubation von *B. lusitaniae* in mit EDTA vorbehandeltem NHS keine Aktivierung auf, da EDTA die Komplementkaskade sowohl über den klassischen, als auch den alternativen Weg inhibiert.

4.3 Analyse der Interaktion von *B. lusitaniae* mit Faktor H

4.3.1 Identifikation Faktor H-bindender Proteine bei *B. lusitaniae*

Der Mechanismus der Rekrutierung löslicher Komplementregulatoren zur Umgehung der Komplementaktivierung im Wirt ist bei Mikroorganismen weit verbreitet. Verschiedene humanpathogene Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten sind in der Lage, v. a. Faktor H und FHL-1, aber auch C4BP zu binden. Es ist bereits gelungen, eine Vielzahl an Proteinen und anderen Oberflächenstrukturen zu identifizieren, welche diese Bindung vermitteln. Hier seien im Folgenden einige Beispiele genannt. Innerhalb der Gattung *Streptococcus* binden das M-Protein von *Streptococcus pyogenes*, das Bac-Protein der Gruppe B-Streptokokken und das Hic-Protein von *Streptococcus pneumoniae* Faktor H und FHL-1. Das mit Hic Homologien aufweisende YadA-Protein von *Yersinia enterocolica* bindet Faktor H, ebenso wie das Tuf-Protein von *Pseudomonas aeruginosa*, die Glykoproteine gp41 und gp120 des HI-Virus 1, das NS1-Protein des West-Nil-Virus und die Proteine CRASP-1 und Gpm1p von *Candida albicans*. Bei *Neisseria gonorrhoe* konnte eine Bindung von Faktor H und FHL-1 durch Lipooligosaccharide (LOS) der Zellmembran sowie durch das Por1A-Protein nachgewiesen werden, während die Parasiten *Echinococcus granulosus* und *Onchocerca volvulus* Faktor H ebenfalls über Oberflächenbestandteile akquirieren (Areschoug et al., 2002; China et al., 1993; Chung et al., 2006; Irigoín et al., 2008; Janulczyk et al., 2000; Johnsson et al., 1998; Kunert et al., 2007; Meri et al., 2002a, 2002b, 2004; Pintér et al., 1995; Poltermann et al., 2007; Ram et al., 1998a, 1998c; Stoiber et al., 1997).

Im Jahr 2001 identifizierten Kraiczy et al. bei *B. afzelii* die ersten zwei Proteine, welche die löslichen Komplementregulatoren des alternativen Weges, Faktor H und FHL-1, binden und als Complement Regulator-acquiring surface protein-1 und -2 (CRASP-1 und -2) bezeichnet wurden (Kraiczy et al., 2001c). In den darauffolgenden Jahren wurden auch bei *B. burgdorferi* und *B. spielmanii* orthologe CRASP-Proteine identifiziert und charakterisiert, sowie drei weitere CRASP-Proteine, CRASP-3, -4 und -5 (bzw. ErpP, ErpC und ErpA) von *B. burgdorferi* und *B. afzelii*, welche zur Erp-Proteinfamilie gehören. Die Expression von CRASP-1 und CRASP-2 führt bei Borrelien zu einem serumresistenten Phänotyp und wird mit einer erhöhten Erregervirulenz in Verbindung gebracht (Alitalo et al., 2004; Brooks et al., 2006; Herzberger et al., 2007; Kraiczy et al., 2001a, 2004; Siegel et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *B. lusitaniae*-Isolate zunächst mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse auf das Vorhandensein potentiell Faktor H-bindender Proteine untersucht. Hierbei konnte bei dem Isolat MT-M8 nach vergleichsweise längerer Detektion

ein potentiell Faktor H-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kD nachgewiesen werden (s. Ergebnisse, Abb. 3.6). Die lange Detektionszeit erklärt die zusätzlichen unspezifischen Signale, welche bei allen untersuchten Isolaten, auch den Vergleichsstämmen der Genospezies *B. burgdorferi* und *B. garinii* aufgetreten waren. Bei *B. burgdorferi* LW2 konnten die Faktor H-bindenden Proteine BbCRASP-1, BbCRASP-3 und BbCRASP-5 identifiziert werden. In der Literatur sind zusätzlich zwei weitere Faktor H-bindende Proteine, BbCRASP-2 und BbCRASP-4, bei *B. burgdorferi* LW2 beschrieben. Diese beiden Proteine binden Faktor H im Vergleich mit BbCRASP-1, -3 und -5 relativ schwach und werden von in Kultur gehaltenen Borrelien nur in geringen Mengen synthetisiert (Haupt et al., 2007; Kraiczy et al., 2001a, 2002). Sie konnten daher mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse im Ganzzelllysate nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass auch *B. lusitaniae*, außer dem identifizierten 16 kD-Protein von Isolat MT-M8, weitere Faktor H-bindende Proteine besitzt, welche aufgrund einer sehr schwachen Bindung von Faktor H nicht nachweisbar waren. Das Ergebnis, dass *B. garinii* G1 keine Faktor H-bindenden Proteine besitzt, steht im Einklang mit früheren Untersuchungen (Kraiczy et al., 2001b; Siegel et al., 2008).

4.3.2 Analyse der an *B. lusitaniae* gebundenen Proteine der Faktor H-Proteinfamilie

CRASP-Proteine verschiedener Borreliengenospezies können neben den humanen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 weitere Proteine der Faktor H-Familie binden. Haupt et al. beschrieben die Bindung von FHR-1, dessen C-terminale SCRs 3, 4 und 5 zu 100 %, 100 % bzw. 97 % den C-terminalen SCRs 18, 19 und 20 von Faktor H entsprechen, an *B. burgdorferi* LW2 BbCRASP-3, -4 und -5 (Haupt et al., 2007).

Auch für andere Mikroorganismen wurde eine Bindung von Proteinen der Faktor H-Familie beschrieben, unter anderem die Bindung von FHR-1 durch *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Borrelia hermsii* und die Bindung von FHR-3 durch das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* (Behnsen et al., 2008; Haupt et al., 2008; Kotarsky et al., 1998; Kunert et al., 2007; Rossmann et al., 2007).

Um die Bindung von Proteinen der Faktor H-Familie an *B. lusitaniae* zu analysieren, wurde ein Serumadsorptionstest durchgeführt. Diese Methode erlaubt die zusätzliche Differenzierung der verschiedenen Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie. Somit konnte gezeigt werden, dass alle *B. lusitaniae*-Isolate in der Lage waren, Faktor H zu binden. Diese Bindung scheint jedoch sehr schwach ausgeprägt zu sein, da die Ligandenaffinitätsblotanalyse keine deutlichen Signale lieferte (s. Kapitel 4.3.1). Zusätzlich ließ sich mittels

Serumadsorption bei insgesamt 8 Isolaten, darunter Isolat MT-M8, eine Bindung von FHR-1 nachweisen, sowie eine schwache Bindung von FHR-2 bei dem Isolat MT-M8. Die FHR-Proteine werden mit einer modulierenden Funktion der Komplementaktivierung in Verbindung gebracht, ihre Bedeutung ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt (Hellwage et al., 1999; Józsi und Zipfel, 2008; McRae et al., 2005).

4.3.3 Analyse der Kofaktoraktivität von an *B. lusitaniae* gebundenem Faktor H

Die serumresistenten Borreliengenospezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. spielmanii* sind in der Lage, die löslichen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 aus dem Serum zu akquirieren und dadurch deren Kofaktoraktivität zu nutzen (Alitalo et al., 2001; Herzberger et al., 2007; Kraiczy et al., 2001b, 2003; McDowell et al., 2003). Den Mechanismus der Bindung von humanen Komplementregulatoren wurde auch für andere Bakterienspezies sowie für Viren und Pilze beschrieben, unter anderem für Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken, Neisserien, Yersinien, das HI-Virus, *Candida albicans* und *Aspergillus*. Auch bei den Parasiten *Echinococcus spp.* und *Onchocerca volvulus* wurde die Fähigkeit zur Bindung von Komplementregulatoren, insbesondere von Faktor H, an der Oberfläche gezeigt (Biedzka-Sarek et al., 2005; Blackmore et al., 1998; Datta und Rappaport, 2006; Diaz et al., 1997; Jarva et al., 2003; Kotarsky et al., 1998; Kraiczy und Würzner, 2006; Lambris et al., 2008; Meri et al., 2002a, 2002b; Ram et al., 1998b; Vogl et al., 2008).

Bei 12 der 16 in dieser Arbeit untersuchten *B. lusitaniae*-Isolaten konnte trotz Bindung von Faktor H keine Kofaktoraktivität detektiert werden. Bei 4 Isolaten, nämlich den süddeutschen Isolaten RBU Pm2-N6, HHS La1-L3, BBWS2-W2 und IP-N1, waren sehr schwache Signale für die C3b-Spaltprodukte α' -68 kD-Kette, α' -46 kD-Kette und α' -43 kD-Kette nachweisbar. Da das Experiment mehrfach mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt wurde, ist eine Verunreinigung der Proben als Ursache für den Nachweis von C3b-Spaltprodukten unwahrscheinlich. Es ist daher zu vermuten, dass das an RBU Pm2-N6, HHS La1-L3, BBWS2-W2 und IP-N1 gebundene Faktor H-Molekül eine geringe Kofaktor-Aktivität entfaltet. Aufgrund der Ergebnisse des Serumadsorptionstests, bei denen eine schwache Bindung von Faktor H an alle *B. lusitaniae*-Isolate gezeigt werden konnte (s. Ergebnisse, Abb. 3.7), lässt sich spekulieren, dass die komplementregulierende Funktion des gebundenen Faktor H nicht ausreicht, um eine effiziente Inhibition der aktivierten Komplementkaskade zu bewirken. Eine Bedeutung dieses Mechanismus für das Überleben von *B. lusitaniae* in Gegenwart von humanem Serum ist aufgrund der geringen Quantität der gespaltenen C3b-

Moleküle unwahrscheinlich, was mit dem serumsensiblen Phänotyp dieser Genospezies vereinbar ist.

4.4 Charakterisierung eines Faktor H-bindenden Proteins von *B. lusitaniae*

4.4.1 Analyse des für das Faktor H-bindende Protein von *B. lusitaniae* MT-M8 kodierenden Gens

Bei dem *B. lusitaniae*-Isolat MT-M8 konnte mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse ein potentiell Faktor H-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kD nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben, sind die Faktor H-bindenden CRASP-Proteine BbCRASP-5/ErpA, BbCRASP-4/ErpC und BbCRASP-3/ErpP von *B. burgdorferi* in der Lage, sowohl Faktor H, als auch FHR-1 zu binden. Das Molekulargewicht dieser Proteine beträgt zwischen 19,8 und 17,7 kD (Alitalo et al., 2002; Haupt et al., 2007; Hellwage et al., 2001; Metts et al., 2003; Stevenson et al., 2001a). Der Nachweis der Faktor H- und FHR-1-Bindung bei *B. lusitaniae* MT-M8 und aufgrund des Molekulargewichtes des identifizierten, potentiellen Faktor H-Bindeproteins von ca. 16 kD, ließ sich vermuten, dass dieses Protein ebenfalls zur Erp-Proteinfamilie gehört. Eine Amplifikation des kodierenden Gens gelang mittels PCR mit Starteroligonukleotiden, welche bereits für die Amplifikation von erp-Genen von *B. burgdorferi* verwendet worden waren (P. Kraiczy, persönliche Mitteilung).

Die Aminosäuresequenz des so amplifizierten Gens wurde mittels Homologievergleich mit Faktor H-bindenden Proteinen verschiedener *B. burgdorferi*-Stämme der Erp-Proteinfamilie verglichen (s. Ergebnisse, Abb. 3.12). So konnte die Zugehörigkeit zur Erp-Proteinfamilie festgestellt werden. In Analogie zu der Nomenklatur der CRASP-Proteine von *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. spielmanii* wurde das Faktor H-bindende Protein von *B. lusitaniae* MT-M8 als BICRASP-3 (MT-M8) bezeichnet.

4.4.2 Charakteristika des Faktor H-bindenden BICRASP-3 Proteins von *B. lusitaniae* MT-M8

Umfangreiche Sequenzvergleiche verschiedener Proteine der Erp-Familie ergab, dass nur wenige Proteine mit höheren Aminosäurehomologien in der Lage waren, humanen Faktor H zu binden (Akins et al., 1999; Alitalo et al., 2002, 2004; Brissette et al., 2007; Hellwage et al., 2001; Kraiczy et al., 2003, 2004; Metts et al., 2003; Stevenson et al., 2001a). Der Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Faktor H-bindender Proteine der Erp-Familie ergab prozentuale Identitätswerte von 73,9 % bis 86,5 % zwischen den verschiedenen

B. burgdorferi Erp-Proteinen. Für BICRASP-3 ließen sich Identitätswerte von ca. 63 % im Vergleich mit OspE von *B. burgdorferi*-Stamm 297 und bis 59 % mit Erp47 von *B. burgdorferi*-Stamm Sh-2-82 ermitteln (s. Tab. 4.1).

	BICRASP-3 (MT-M8)	ErpA (B31)	ErpC (B31)	ErpP (B31)	Erp47 (Sh-2-82)	OspE (297)
ErpA (B31)	61,2	-	-	-	-	-
ErpC (B31)	61,2	82,0	-	-	-	-
ErpP (B31)	61,2	78,5	75,6	-	-	-
Erp47 (Sh-2-82)	59,4	75,6	76,2	86,5	-	-
OspE (297)	63,2	83,6	96,5	77,0	73,9	-
OspE (N40)	60,0	82,6	79,1	83,1	84,3	80,0

Tab. 4.1, Aminosäuresequenzvergleich verschiedener Faktor H-bindender Erp-Proteine. Die Identitäten sind in % angegeben. Die Berechnung erfolgte mit dem MegAlign 4.0 Modul von DNASTAR.

Die für die Bindung von Faktor H essentiellen Aminosäuren bzw. Regionen innerhalb des Faktor H-bindenden OspE-Proteins wurden bereits analysiert. Alitalo et al. beschrieben fünf potentielle Bindungsregionen für Faktor H, die alle in den konservierten Bereichen des Proteins lokalisiert werden konnten. Dabei wurde eine Bindungsregion am N-Terminus und vier weitere im C-terminalen Bereich identifiziert (s. Abb. 4.1). Des Weiteren wurde beschrieben, dass die im C-terminalen Bereich gelegenen Lysinreste an der Faktor H-Bindung beteiligt sein sollen (Alitalo et al., 2002, 2004). Die für die Bindung von Faktor H wichtigen Regionen lassen sich ebenfalls im BICRASP-3 Protein von *B. lusitaniae* nachweisen. Allerdings ergaben sich aufgrund des Sequenzvergleichs des OspE-Proteins mit BICRASP-3 in den Bindungsregionen I, III und V jeweils ein nicht konservierter Aminosäureaustausch eines negativ geladenen Glutamats gegen das positiv geladene Lysin mit daraus folgender Ladungsumkehr (Aminosäurepositionen 53, 149 und 179 von BICRASP-3). Dies könnte eine Erklärung für die schwache Bindung von Faktor H an BICRASP-3 im Vergleich zu BbCRASP-3 darstellen (s. Kapitel 4.4.3). Weiterhin besitzt auch BICRASP-3 C-terminale Lysinreste in konservierten Bereichen. Auffällig waren dabei die oben beschriebenen zusätzlichen Lysinreste, welche durch einen Austausch von Glutamat zustande kamen. Eine weitere auffällige Abweichungen der Aminosäuresequenz von BICRASP-3 zu anderen *B. burgdorferi* Erp-Proteinen im Sinne eines nicht konservierten Aminosäureaustauschs war ein Austausch des positiv geladenen Lysins durch das negativ geladene Glutamat an Position 128 von BICRASP-3.

Mitarbeitern beschriebene wichtige α -Helix 3 im BbCRASP-5/ErpA-Protein ist auch bei BICRASP-3 vorhanden (h4, s. Abb. 4.1). Einigkeit herrscht bei allen genannten Autoren, dass die konservierten Bereiche für die Interaktion mit Faktor H eine essentielle Rolle spielt.

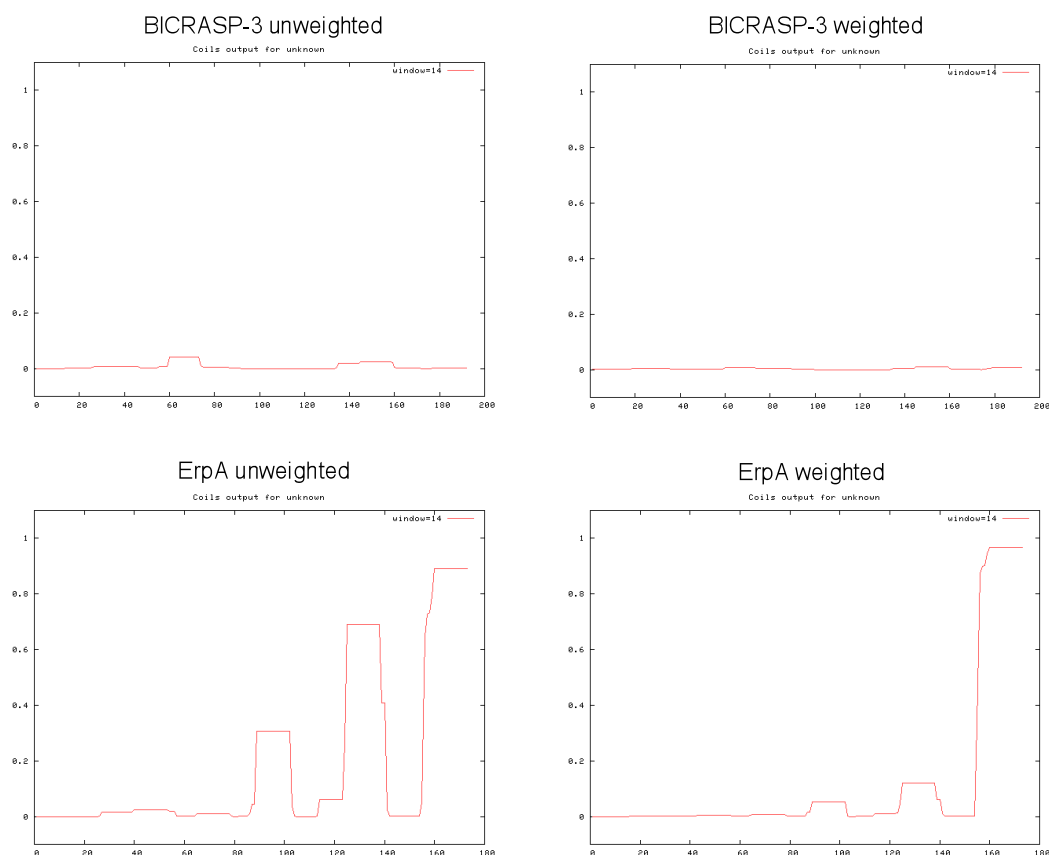


Abb. 4.2, Vorhersage potentieller coiled-coil Motive im BICRASP-3-Molekül. Die Vorhersage erfolgte anhand der Aminosäuresequenz von BICRASP-3 (MT-M8) und BbCRASP-5/ErpA (B31) (s. Ergebnisse, Abb. 3.12) mit dem Programm COILS (Lupas et al., 1991).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BICRASP-3 v. a. im C-terminalen Bereich des Proteins große homologe Bereiche mit anderen Faktor H-bindenden Proteinen der Erp-Familie von *B. burgdorferi* aufweist. Gleichzeitig bestehen große Übereinstimmungen von konservierten Regionen, welche ebenfalls zum größeren Teil im Bereich des C-Terminus vorliegen. Mittels Computeranalyse konnten fünf potentielle α -Helices bei BICRASP-3 und BbCRASP-5/ErpA (Stamm B31) identifiziert werden, von denen vier in homologen Proteinabschnitten lokalisiert waren. Weiterhin lagen bei BICRASP-3 nicht konservierte Aminosäureaustausche in potentiell für die Faktor H-Bindung wichtigen Bereichen vor. Im Gegensatz zu BbCRASP-5/ErpA (Stamm B31) war es nicht möglich, mittels Computeranalyse coiled-coil-Motive innerhalb des BICRASP-3 Proteins nachzuweisen. Die dreidimensionale Struktur der Faktor H-bindenden Proteine der Erp-Familie ist jedoch bisher noch nicht aufgeklärt. Es lässt sich daher vermuten, dass die schwache Bindung von Faktor H

an BICRASP-3 einerseits durch die unterschiedliche Topologie, andererseits durch die Aminosäureaustausche bedingt ist.

4.4.3 Analyse des Bindungsverhaltens von Faktor H an BICRASP-3

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens von BICRASP-3 (MT-M8) gegenüber verschiedenen Proteinen der Faktor H-Familie im Vergleich mit dem Bindungsverhalten der *B. burgdorferi* CRASP-Proteine BbCRASP-1, -2 und -3 erfolgte mittels Ligandenaffinitätsblotanalyse.

Hierbei war eine schwache Bindung von Faktor H an BICRASP-3 nachweisbar, eine Bindung von FHL-1 und FHR-1 an BICRASP-3 konnte dagegen nicht detektiert werden. Die schwache Bindung von Faktor H an BICRASP-3 steht in Einklang mit den Ergebnissen des Serumadsorptionstests, in dem der Ursprungstamm von BICRASP-3, *B. lusitaniae* MT-M8, eine Bindung von Faktor H gezeigt hatte. Der fehlende Nachweis der Bindung von FHL-1, welches den 7 N-terminalen SCRs von Faktor H entspricht, ist mit der Lokalisierung der Interaktionsdomäne von Faktor H mit BICRASP-3 innerhalb der C-terminalen SCRs 19-20 vereinbar (s. Ergebnisse, Kapitel 3.4.3) und wurde auch in der Literatur für die Faktor H-bindenden Proteine der Erp-Familie beschrieben (Alitalo et al., 2004; Hellwage et al., 2001; Kraiczy et al., 2001a, 2002, 2003; Stevenson et al., 2006). Darüber hinaus konnte eine starke Bindung von FHR-1 an BbCRASP-4 und BbCRASP-5 sowie eine schwache Bindung von FHR-1 an BbCRASP-3 nachgewiesen werden (Haupt et al., 2007). BICRASP-3 zeigte jedoch keine Bindung von FHR-1. Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, da das Ursprungsisolat von BICRASP-3, *B. lusitaniae*-Isolat MT-M8, eine Bindung von FHR-1 aufwies. Des Weiteren stimmen die C-terminalen SCRs 4-5 von FHR-1 zu 100 % bzw. 97 % mit den C-terminalen SCRs 19-20 des Faktor H-Moleküls überein (Józsi und Zipfel, 2008; Zipfel und Skerka, 1994). Da die Interaktion zwischen Faktor H und BICRASP-3 im Bereich von SCR19-20 des Faktor H-Moleküls erfolgt, kann nur spekuliert werden, dass die Topologie von BICRASP-3 oder geringe Abweichungen in der Aminosäuresequenz die Bindung von FHR-1 verhindert. Es könnten auch weitere homologe BICRASP-3 Proteine für die Bindung von FHR-1 verantwortlich sein, die nicht identifiziert werden konnten.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Interaktion verschiedener Proteine der Faktor H-Familie mit BbCRASP-1, -2 und -3 von *B. burgdorferi* bestätigte das in der Literatur beschriebene Bindungsverhalten. Dabei sind BbCRASP-1 und BbCRASP-2 in der Lage, Faktor H und FHL-1 zu binden, jedoch nicht FHR-1. BbCRASP-3/ErpP bindet

Faktor H und FHR-1, jedoch nicht FHL-1 (Haupt et al., 2007; Kraiczy et al., 2001a, 2003, 2004; Rogers und Marconi, 2007; Siegel et al., 2008).

Die Stärke der Bindung von Faktor H an BICRASP-3 wurde mittels ELISA quantifiziert und es zeigte sich, dass diese im Vergleich mit dem orthologen *B. burgdorferi* CRASP-3/ErpP-Protein nur ca. 16 % betrug (s. Ergebnisse, Abb. 3.18).

Die so nachgewiesene schwache Bindung von Faktor H an BICRASP-3 kann durch die oben beschriebenen Abweichungen in der Topologie von BICRASP-3 begründet werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Ursache für die schwache Bindung von Faktor H an BICRASP-3 sowie an die anderen *B. lusitaniae*-Isolate in der Biologie der Spirochäten begründet ist. Es wurde beschrieben, dass die Expression von CRASP-Proteinen bei *B. burgdorferi* vom Zeitpunkt im Vektor-Wirt-Zyklus der Spirochäten abhängig ist. Erp-Proteine werden in der Zecke nur in geringem Maße exprimiert, eine Zunahme der Expression im Wirt wurde dagegen im Mausmodell beobachtet (Akins et al., 1998; Bykowski et al., 2008). Mittels in vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Kultivierungstemperatur der Borrelien zur Nachahmung der Umweltbedingungen im Wirt geeignet ist und dass mit einem Temperaturanstieg auch ein Anstieg der Expression verschiedener Erp-Proteine einhergeht. (Akins et al., 1998; Kraiczy et al., 2001a; Stevenson et al., 1995).

4.4.4 Analyse von Kofaktoraktivität und der Interaktionsdomäne von an BICRASP-3 gebundenem Faktor H

Die Faktor H und FHL-1 bindenden Proteine BbCRASP-1 und BbCRASP-2 verleihen Borrelien einen serumresistenten Phänotyp (Brooks et al., 2005; Hartmann et al., 2006; Siegel et al., 2008). Des Weiteren wurde bewiesen, dass Faktor H, welcher an diese CRASP-Proteine gebunden ist, Kofaktoraktivität besitzt. Die als Kofaktor aktive Domäne von Faktor H und FHL-1 wurde in den N-terminalen SCRs 1-4 lokalisiert (Józsi und Zipfel, 2008; Zipfel und Skerka, 1999). Ebenfalls ließ sich eine Kofaktoraktivität von Faktor H nachweisen, wenn dieser über die C-terminalen SCR-Domänen 19-20 an die Erp-homologen *B. burgdorferi* CRASP-Proteine gebunden ist (Kraiczy et al., 2003).

In dieser Arbeit ließ sich mit verschiedenen Deletionsmutanten von Faktor H und FHL-1 zeigen, dass auch BICRASP-3 Faktor H über die C-terminalen SCR-Domänen 19-20 bindet. Eine Kofaktoraktivität von an gereinigtem BICRASP-3 gebundenem Faktor H war jedoch nicht nachweisbar, was die Ergebnisse der Untersuchungen zur Kofaktoraktivität von an intakte *B. lusitaniae*-Zellen gebundenem Faktor H unterstützt. Mögliche Gründe für die

fehlende Kofaktoraktivität von an BICRASP-3 gebundenem Faktor H könnten sein: 1) eine strukturelle Umlagerung des gebundenen Faktor H-Moleküls durch Bindung an BICRASP-3 und einen damit einhergehenden Verlust der Kofaktoraktivität, 2) eine schwache, ineffiziente Faktor H-Bindung.

4.4.5 Lokalisation von BICRASP-3 auf der Zelloberfläche von *B. lusitaniae*

In der Literatur ist beschrieben, dass alle Erp-Proteine von *B. burgdorferi* B31 oberflächenständige Proteine darstellen. Gleichzeitig sind einige dieser Proteine in situ gegenüber bestimmten Proteasen resistent (El-Hage et al., 2001; Lam et al., 1994). Für OspC von *B. burgdorferi* konnte gezeigt werden, dass dieses Protein aufgrund seiner Faltung Erkennungsregionen von Proteasen blockiert und somit gegenüber Trypsin resistent ist (Zückert et al., 2001). Möglicherweise besitzen auch die Trypsin-resistenten Erp-Proteine eine, den Angriff spezifischer Proteasen inhibierende Struktur. Alternativ ist denkbar, dass Erp-Proteine mit anderen Membranproteinen interagieren und auf diese Weise vor der Proteolyse durch Trypsin geschützt sind (Bunikis und Barbour, 1999), oder dass Schnittstellen von Trypsin bei Erp-Proteinen in situ sterisch durch Glykosylreste blockiert werden (Benz und Schmidt, 2002).

Mittels Analyse der in situ-Proteasesensitivität von BICRASP-3 und Flagellin mit anschließendem Nachweis der Bindung von Faktor H konnte in dieser Arbeit ein deutlicher Verlust der Faktor H-Bindung nach Behandlung mit der unspezifischen Protease Proteinase K gezeigt werden (s. Ergebnisse, Abb. 3.19). Die Behandlung mit der spezifischen Protease Trypsin führte jedoch zu keiner Reduktion der Signalstärke von BICRASP-3 im Vergleich zu unbehandelten Zellen von *B. lusitaniae* MT-M8. Gleichzeitig konnte das periplasmatisch gelegene intakte Flagellin nachgewiesen werden, was eine Beschädigung der Zellmembran der Spirochäten mit anschließender Hydrolyse submembranärer Proteine ausschließt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BICRASP-3 ein auf der äußeren Membran exponiertes Protein von *B. lusitaniae* MT-M8 darstellt. Die Resistenz des Proteins gegenüber Trypsin steht in Einklang mit früheren Untersuchungen der Erp-Proteine von *B. burgdorferi* (El-Hage et al., 2001).

4.5 Identifizierung *erp*-orthologer Gensequenzen bei verschiedenen *B. lusitaniae*-Isolaten

4.5.1 Analyse BICRASP-3-orthologer Gensequenzen von *B. lusitaniae*

Mit Primern für das BICRASP-3 kodierende Gen des *B. lusitaniae*-Isolats MT-M8 konnten bei weiteren 15 untersuchten *B. lusitaniae*-Stämmen ebenfalls Gensequenzen amplifiziert werden. Dabei trat bei dem Stamm MT-M8 nur ein Amplifikat auf, bei den zwei weiteren Stämmen MT-M3 und MT-W16 jeweils zwei Amplifikate. Bei 13 Isolaten führten die verwendeten Primer zur Amplifikation multipler DNA-Abschnitte verschiedener Größe (s. Ergebnisse, Abb. 3.20). Mit der Erhöhung der Anlagerungstemperatur von 50°C auf 60°C, die zu einer spezifischeren Anlagerung der Starteroligonukleotide führen sollte, ließ sich jedoch keine Reduktion der Anzahl amplifizierter DNA-Abschnitte erreichen. Um die verschiedenen amplifizierten DNA-Sequenzen zu identifizieren, wurden die Amplifikate des portugiesischen Zeckenisolats MT-M3 und der zwei süddeutschen Zeckenisolaten RBU Pm2-N6 und RBU La5-L2 kloniert und sequenziert. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mittels Homologievergleich analysiert. Hierbei konnten bei den Isolaten MT-M3 und RBU La5-L2 orthologe Aminosäuresequenzen zu BICRASP-3 von MT-M8 identifiziert werden, welche nach der Jotun-Hein-Methode Identitäten von 75,5 % (MT-M3) bzw. 75 % (RBU La5-L2) mit BICRASP-3 (MT-M8) aufwiesen. Diese, als BICRASP-3 (MT-M3) und BICRASP-3 (RBU La5-L2) bezeichneten Proteine, waren untereinander zu 91,7 % identisch. Da alle *B. lusitaniae*-Stämme im Serumadsorptionstest eine Bindung von Faktor H aus dem Serum gezeigt hatten, lässt sich vermuten, dass auch weitere Isolate, welche hier nicht im einzelnen auf BICRASP-3 orthologe Gensequenzen untersucht wurden, entsprechende Gene für potentiell Faktor H-bindende Proteine besitzen. Dass unter in vitro Bedingungen Borrelien eine geringe Expression von Erp-Proteinen aufweisen, ist bereits beschrieben (Stevenson et al., 2006). Aufgrund der verwendeten Oligonukleotide war es in dieser Arbeit nicht möglich, die 5'-nicht kodierenden Sequenzen und die potentielle Promotorregion auf bekannte, regulative Elemente zu analysieren.

Weitere, aus der amplifizierten DNA-Sequenz abgeleitete Proteinsequenzen, konnten mittels Homologievergleich als ErpL/ErpY-orthologe Proteine identifiziert werden. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Individuen eines Borrelienstammes multiple *erp*-Loci besitzen, welche auf unterschiedlichen cp32-Plasmiden zu finden sind und zum Teil bicistronisch angeordnet sind (Stevenson et al., 2001b). Welche externen Einflüsse, wie z.B.

Temperatur und pH-Wert, die Expression der Erp-kodierenden Gene verstärken bzw. inhibieren, ist bisher jedoch nicht vollständig geklärt.

ErpL und ErpY stellen keine Faktor H-bindenden Proteine dar (Brissette et al., 2007; Stevenson et al., 2006). Sie könnten jedoch eine Funktion im Rahmen des Immunescares und der daraus resultierenden Erregerpersistenz besitzen, z.B. durch Bindung Wirt-spezifischer immunregulatorischer Proteine. Möglich ist auch, dass die multiplen *erp*-Loci in Borrelien Bereiche für homologe Rekombinationsvorgänge zur Anpassung an neue Wirte darstellen (Stevenson et al., 2001b). Rekombinationsvorgänge im Borreliengenom während der Persistenz des Erregers im Wirt werden jedoch weitestgehend ausgeschlossen, daher werden solche Vorgänge für den Zeitraum während des Verbleibs der Borrelien in der Zecke vermutet. Das Vorhandensein von Erp-kodierenden Genen ist auf die Borrelienspezies des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes beschränkt. Homologe Gensequenzen wurden bei den verwandten Rückfallfieber-Borrelien nicht nachgewiesen. Dies ist ein Hinweis auf die Bedeutung der Proteine für die spezielle Biologie dieser Borrelienspezies (El-Hage et al., 1999; Hefty et al., 2002; McDowell et al., 2001; Stevenson, 2002, 2006; Sung et al., 2000).

Die identifizierten ErpL/Y orthologen Proteine von MT-M3, RBU Pm2-N6 und RBU La5-L2 wurden aufgrund von Unterschieden in der Aminosäuresequenz in 3 Gruppen unterteilt (s. Ergebnisse, Kapitel 3.5.2). Diese Unterschiede im ErpL/Y-Protein des portugiesischen Isolats MT-M3 und der analysierten süddeutschen Isolate kommen möglicherweise durch die unterschiedliche Entwicklung der *B. lusitaniae*-Stämme durch geographische Isolation aufgrund des nur regional verbreiteten Wirts zustande, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde (Grego et al., 2007; Vitorino et al., 2008).

4.6 Identifizierung BICRASP-3-orthologer Gensequenzen innerhalb der Genospezies *B. lusitaniae*

4.6.1 Analyse der Plasmide von *B. lusitaniae*-Isolaten und Lokalisierung *erp*-homologer Gensequenzen

Bei *B. burgdorferi* B31 wurde das Vorhandensein von bis zu 24 extrachromosomalen DNA-Elementen beschrieben, welche bezüglich Anzahl und Größe sehr heterogen sind. Auch verschiedene Stämme der gleichen Genospezies besitzen ein unterschiedliches Plasmidprofil. Auch die Analyse des Plasmidprofils verschiedener *B. lusitaniae*-Isolate zeigte ein sehr heterogenes Bild (s. Ergebnisse, Abb. 3.24). Es konnten jedoch Übereinstimmungen mit den bei *B. burgdorferi* regelmäßig vorhandenen Plasmiden cp26, lp54 und cp32 bei vielen

B. lusitaniae-Isolaten gezeigt werden (Casjens et al., 1997, 2000; Miller et al., 2000; Rosa et al., 2005). Alle *B. lusitaniae*-Isolate besaßen ein ca. 60 kb großes Plasmid, auf welchem das OspA-Gen lokalisiert war (s. Ergebnisse, Kapitel. 3.6.2). Diese Plasmide sind möglicherweise mit den bei allen Lyme-Borrelien vorkommenden lp54-Plasmiden vergleichbar, welche die für mehrere Virulenz-assoziierte Proteine, z.B. OspA, OspB und BbCRASP-1 kodierenden Gene tragen (Stevenson et al., 2006).

Die mono- bzw. bicistronischen *erp*-Loci der gut untersuchten *B. burgdorferi*-Stämme B31, N40, Sh-2-82 und 297 wurden auf den multiplen zirkulären cp32-Plasmiden lokalisiert, wobei jedoch Deletions- und Translokationsvorgänge beschrieben wurden, welche zu Änderungen der Plasmidgrößen geführt haben. Diese Plasmide scheinen von einem cp32 Plasmid abzustammen und besitzen ebenfalls *erp*-Loci. Beispiele hierfür sind die cp18-Plasmide der *B. burgdorferi*-Stämme N40 und 297, welche durch Deletion von DNA-Abschnitten von cp32-Plasmiden entstanden sind. Auch lp56 von *B. burgdorferi* B31, die cp9-Plasmide von *B. burgdorferi* B31, N40 und Ip21 und das bei allen Lyme-Borrelien vorhandene lp54-Plasmid stammen von cp32 ab (Caimano et al., 2000; Casjens et al., 2000; Casjens, 2001; Dunn et al., 1994; Stevenson et al., 1997, 2001b; Stevenson und Miller, 2003; Stewart et al., 2001).

Der Nachweis *erp*-homologer DNA-Abschnitte auf den Plasmiden von *B. lusitaniae* mittels Southernblot erfolgte mit einer Sonde, die die Nukleotidsequenz des BICRASP-3 kodierenden Gens von *B. lusitaniae* MT-M8 repräsentiert. Bei 11 untersuchten *B. lusitaniae*-Isolate wurden so multiple, bei weiteren 5 Stämmen (MT-M3, MT-M5, MT-W16, ZWU3-N4 und IP-N1) ein einzelner *erp*-Locus detektiert (s. Ergebnisse, Abb. 3.25). Diese waren auf Plasmiden unterschiedlicher Größe lokalisiert. Das Vorhandensein multipler *erp*-Loci kann das nach PCR-Amplifikation von *erp*-homologen DNA-Abschnitten erhaltene Bandenmuster mit multiplen, schwierig abzugrenzenden Signalen erklären (s. Ergebnisse, Abb. 3.20). Übereinstimmungen von Plasmid- und Hybridisierungsmuster im Southernblot traten bei 5 süddeutschen Isolaten (RBU Pm2-N6, RBU La5-L2 und HHS La1-L3 sowie BBWS2-W2 und ZWS-W1) und 2 portugiesischen Isolaten (MT-M8 und MT-W4) auf, was möglicherweise eine nahe Verwandtschaft der Stämme widerspiegelt und mit der geographischen Nähe des Ursprungsgebiets dieser Isolate begründet werden kann (Grego et al., 2007; Vitorino et al., 2008).

Bei den Genospezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* konnten dagegen mit der verwendeten BICRASP-3-Gensonde unter stringenten Waschbedingungen (s. Methoden, Kapitel 2.2.2.8) keine homologen DNA-Abschnitte nachgewiesen werden, obwohl die

Aminosäuresequenzen von BbCRASP-5/ErpA, BbCRASP-4/ErpC und BbCRASP-3/ErpP von *B. burgdorferi* mit BICRASP-3 (MT-M8) zu 60 % identisch sind (s. Tab. 4.1). Dies ist damit zu erklären, dass auf DNA-Ebene größere Unterschiede in der Nukleotidsequenz bestehen, als auf Ebene der abgeleiteten Aminosäuresequenz.

5. Zusammenfassung/ Abstract

5.1 Zusammenfassung

Borrelia lusitaniae, eine vorwiegend im Mittelmeerraum/ Südwesteuropa vorkommende Borrelienspezies des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes, wird derzeit als eine potentiell humanpathogene Genospezies diskutiert. Für vergleichende Studien stehen derzeit vorwiegend Zeckenisolate und nur zwei Patientenisolate zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 16 Isolate, darunter ein Patientenisolat aus verschiedenen Regionen Portugals und Süddeutschlands im Bezug auf ihre Serumempfindlichkeit/-resistenz gegenüber humanem Serum und der Fähigkeit Komplementregulatoren aus Serum zu binden, untersucht. Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass *B. lusitaniae*, mit Ausnahme des Stammes IP-N1, als serumsensible Genospezies klassifiziert werden kann. Alle Isolate aktivierten die Komplementkaskade hauptsächlich über den alternativen Weg wobei massiv Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche deponiert wurden. Die effiziente Aktivierung und Ablagerung des terminalen Komplementkomplexes führte zur vermehrten Ausbildung sogenannter Blebs, Ausstülpungen der äußeren Membran, was auf eine effiziente Lyse der Borrelienzellen hinwies. Obwohl serumsensibel, waren alle Isolate in der Lage, den löslichen Komplementregulator des alternativen Weges, Faktor H aus dem Serum zu binden. Allerdings konnte nur bei 4 der 16 untersuchten Isolate eine schwache komplementregulatorische Aktivität von zellgebundenem Faktor H durch den Nachweis spezifischer C3b-Spaltprodukte bestätigt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Faktor H in seiner Eigenschaft als Komplementregulator inhibiert ist.

Durch weiterführende Analysen konnte ein Faktor H-bindendes Protein von 16 kD bei *B. lusitaniae* MT-M8 identifiziert und charakterisiert werden. Dieses als BICRASP-3 bezeichnete Protein war in der Lage, Faktor H über dessen C-terminale SCR-Domänen 19-20 zu binden. Im Vergleich zu anderen mit Faktor H interagierenden Proteinen war die Bindung sehr schwach und erreichte nur ca. 16% der Bindungsstärke von BbCRASP-3, was eine nicht nachweisbare Kofaktoraktivität von an BICRASP-3 gebundenem Faktor H erklären könnte. Sequenzanalysen und Untersuchungen mit verschiedenen Proteasen identifizierten BICRASP-3 als ein auf der Oberfläche von *B. lusitaniae* lokalisiertes Lipoprotein, welches eindeutig zur heterologen Erp-Proteinfamilie gehört. Interessanterweise ist bei BICRASP-3 jener Bereich am C-Terminus konserviert, der als Faktor H-Bindungsstelle erachtet wird. Die nicht konservierten Austausche einzelner Aminosäuren innerhalb der vermuteten

Bindungsregion und das Fehlen höher geordneter Strukturen, wie z.B. coiled-coils, könnten die stark reduzierte Bindungskapazität von Faktor H an BICRASP-3 erklären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die schwache Bindung von Faktor H und die Inhibition der komplementregulatorischen Aktivität von Faktor H, als Ursachen für den fehlenden Schutz vor der durch Komplement vermittelten Lyse angenommen werden kann, wodurch die untersuchten *B. lusitaniae*-Isolate einen serumsensiblen Phänotyp aufweisen.

Des Weiteren konnten bei allen untersuchten *B. lusitaniae* Isolaten *erp*-homologe Gensequenzen auf Plasmiden unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Manche Isolate wiesen multiple *erp*-Loci auf. Durch PCR konnten *erp*-homologe Gensequenzen amplifiziert werden, die für ErpL/ErpY-orthologe Proteine kodieren und nicht mit Faktor H interagieren. Welche Funktion diese Proteine für Borrelien besitzen bleibt weiterhin ungeklärt. Es ist denkbar, dass diese Proteine bei der Erregerpersistenz oder dem Immunescape in der Eidechse als natürlichem Wirt eine wichtigen Rolle spielen oder Borrelien ermöglichen, sich an andere Reservoirwirte anzupassen.

5.2 Abstract

Borrelia lusitaniae delineated as a novel genospecies of the *B. burgdorferi* sensu lato complex is predominantly found in ticks collected from the Mediterranean region in the southwest of Europe. It is still unclear, whether this genospecies causes Lyme disease in humans. Mainly isolates obtained from ticks are available for comparative studies and there are only two isolates obtained from Lyme disease patients. In this study 16 isolates of different regions of Portugal and southern Germany, including a human isolate, were characterised in regard to their ability to resist complement-mediated killing in human serum and their ability to acquire human regulators of complement.

The results of this study show that *B. lusitaniae*, except isolate IP-N1, is a serum sensitive genospecies. All isolates activated complement predominantly via the alternative pathway which in turn resulted in the deposition of huge amounts of activated complement components on the outer cell surface. Activation and accumulation of the membrane attack complex led to the formation of so-called blebs, drastical morphological changes and protuberances of the outer membrane. This phenomenon clearly indicates efficient lysis of the spirochetes. Though *B. lusitaniae* was characterised as a serum sensitive genospecies, all isolates analysed bound factor H, a soluble complement regulator of the alternative pathway from human serum. Via detection of specific cleavage products of C3b, a weak complement regulatory activity of cell bound factor H could only be demonstrated for 4 out of 16 isolates.

Further analysis identified and characterised a factor H binding protein with a molecular mass of 16 kDa of the *B. lusitaniae* isolate MT-M8. This protein, BICRASP-3, was able to bind factor H via the C-terminal SCR domains 19 to 20. In comparison to other factor H binding CRASP proteins the interaction of BICRASP-3 with factor H appeared to be rather weak and represents only 16 % of the binding intensity of the *B. burgdorferi* BbCRASP-3 protein. The weak binding capacity of BICRASP-3 might be the reason for a barely measurable regulatory activity of cell-bound factor H in some isolates. Sequence analysis and protease assays identified BICRASP-3 as a surface exposed lipoprotein belonging to the polymorphic Erp protein family. Interestingly, the C-terminus considered to be essential for factor H binding, is highly conserved in the BICRASP-3 protein. It is suggested that the non-conserved substitution of individual amino acids in the proposed binding region and the absence of higher order structures such as coiled-coil may convert BICRASP-3 to a factor H binding molecule exhibiting reduced binding properties.

In summary the weak binding capability of factor H accompanied with the inhibition of its complement regulatory activity may result in a loss of protection of *B. lusitaniae* from complement-mediated lysis and therefore may explain the serum sensitive phenotype.

In addition all *B. lusitaniae* isolates analysed contain *erp*-homologous sequences on various plasmids whereby particular isolates also show multiple *erp* loci. Furthermore, *erp*-homologous sequences encoding for diverse ErpL/ErpY-orthologous proteins could be amplified by PCR. The function of these non-factor H binding proteins in this genospecies is still unclear. It is tempting to speculate that these molecules play a role in immune escape of *B. lusitaniae* during persisting infection of lizards or allow the pathogen to adapt to different reservoir hosts.

6. Literaturverzeichnis

- Akins, D. R., Bourell, K. W., Caimano, M. J., Norgard, M. V. und Radolf, J. D. (1998). A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state. J. Clin. Invest. **101**: 2240-50.
- Akins, D. R., Caimano, M. J., Yang, X., Cerna, F., Norgard, M. V. und Radolf, J. D. (1999). Molecular and evolutionary analysis of *Borrelia burgdorferi* 297 circular plasmid-encoded lipoproteins with OspE- and OspF-like leader peptides. Infect. Immun. **67**: 1526-32.
- Alitalo, A., Meri, T., Rämö, L., Jokiranta, S. T., Heikkilä, T., Seppälä, I. J. T., Oksi, J., Viljanen, M. und Meri, S. (2001). Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: Serum-resistant strains promote C3b inactivation. Infect. Immun. **69**: 3685-91.
- Alitalo, A., Meri, T., Lankinen, H., Seppälä, I., Lahdenne, P., Hefty, P. S., Akins, D. R. und Meri, S. (2002). Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs. J. Immunol. **169**: 3847-53.
- Alitalo, A., Meri, T., Chen, T., Lankinen, H., Cheng, Z.-Z., Jokiranta, T. S., Seppälä, I. J. T., Lahdenne, P., Hefty, P. S., Akins, D. R. und Meri, S. (2004). Lysine-dependent multipoint binding of the *Borrelia burgdorferi* virulence factor outer surface protein E to the C terminus of factor H. J. Immunol. **172**: 6195-201.
- American College of Physicians (1997). Guidelines for laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann. Int. Med. **127**: 1106-8.
- Amore, G., Tomassone, L., Grego, E., Ragagli, C., Bertolotti, L., Nebbia, P., Rosati, S. und Mannelli, A. (2007). *Borrelia lusitaniae* in immature *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) feeding on common wall lizards in Tuscany, central Italy. J. Med. Entomol. **44**: 303-7.
- Aoun, K., Kechrid, A., Lagha, N., Zarrouk, A. und Bouzouaia, N. (1998). La maladie de Lyme en Tunisie, résultats d'une étude clinico-sérologique (1992-1996). Santé **8**: 98-100.
- Areschoug, T., Stalhammar-Carlemalm, M., Karlsson, I. und Lindahl, G. (2002). Streptococcal beta protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. **277**: 12642-8.

- Asbrink, E. und Hovmark, A.** (1985). Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [B] **93**: 161-3.
- Assous, M. V., Postic, D., Paul, G., Névot, P. und Baranton, G.** (1993). Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **12**: 261-8.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M. und Grimont, P. A.** (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**: 378-83.
- Barbour, A. G. und Hayes, S. F.** (1986). Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **50**: 381-400.
- Barbour, A. G., Maupin, G. O., Teltow, G. J., Carter, C. J. und Piesman, J.** (1996). Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. J. Infect. Dis. **173**: 403-9.
- Barral, M., García-Pérez, A. L., Juste, R. A., Hurtado, A., Escudero, R., Sellek, R. E. und Anda, P.** (2002). Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. J. Med. Entomol. **39**: 177-84.
- Behnsen, J., Hartmann, A., Schmalzer, J., Gehrke, A., Brakhage, A. A. und Zipfel, P. F.** (2008). The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. **76**: 820-7.
- Benz, I. und Schmidt, M. A.** (2002). Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. Mol. Microbiol. **45**: 267-76.
- Bernet, J., Mullick, J., Singh, A. K. und Sahu, A.** (2003). Viral mimicry of the complement system. J. Biosci. **28**: 249-64.
- Biedzka-Sarek, M., Venho, R. und Skurnik, M.** (2005). Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. Infect. Immun. **73**: 2232-44.
- Blackmore, T. K., Fischetti, V. A., Sadlon, T. A., Ward, H. M. und Gordon, D. L.** (1998). M protein of the group A *Streptococcus* binds to the seventh short consensus repeat of human complement factor H. Infect. Immun. **66**: 1427-31.
- Brade, V., Kleber, I. und Acker, G.** (1992). Differences of two *Borrelia burgdorferi* strains in complement activation and serum resistance. Immunobiology. **185**: 453-65.

- Breitner-Ruddock, S., Würzner, R., Schulze, J. und Brade, V.** (1997). Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. Med. Microbiol. Immunol. **185**: 253-60.
- Brissette, C. A., Cooley, A. E., Burns, L. H., Riley, S. P., Verma, A., Woodman, M. E., Bykowski, T. und Stevenson, B.** (2007). Lyme borreliosis spirochete Erp proteins, their known host ligands, and potential roles in mammalian infection. Int. J. Med. Microbiol. **298**: 257-67.
- Brissette, C. A., Haupt, K., Barthel, D., Cooley, A. E., Bowman, A., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P. F., Kraiczy, P. und Stevenson, B.** (2009). The *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. Infect. Immun. **77**: 300-6.
- Brooks, C. S., Vuppala, S. R., Jett, A. M., Alitalo, A., Meri, S. und Akins, D. R.** (2005). Complement regulator-acquiring surface protein 1 imparts resistance to human serum in *Borrelia burgdorferi*. J. Immunol. **175**: 3299-308.
- Brooks, C. S., Vuppala, S. R., Jett, A. M. und Akins, D. R.** (2006). Identification of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. Infect. Immun. **74**: 296-304.
- Bunikis, J. und Barbour, A. G.** (1999). Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins. Infect. Immun. **67**: 2874-83.
- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E. und Davis, J. P.** (1982). Lyme disease-a tick borne spirochetosis? Science **216**: 1317-9.
- Busch, U., Will, G., Hizo-Teufel, C., Wilske, B. und Preac-Mursic, V.** (1997). Long-term *in vitro* cultivation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains: Influence on plasmid patterns, genome stability and expression of proteins. Res. Microbiol. **148**: 109-18.
- Bykowski, T., Woodman, M., Cooley, A., Brissette, C. A., Wallich, R., Brade, V., Kraiczy, P. und Stevenson, B.** (2008). *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle. Int. J. Med. Microbiol. **298**: 249-56.
- Caimano, M. J., Yang, X., Popova, T. G., Clawson, M. L., Akins, D. R., Norgard, M. V. und Radolf, J. D.** (2000). Molecular and evolutionary characterization of the cp32/18 family of supercoiled plasmids in *Borrelia burgdorferi* 297. Infect. Immun. **68**: 1574-86.

- Canica, M. M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J. C., Baranton, G. und Postic, D.** (1993). Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand. J. Infect. Dis. **25**: 441-8.
- Casjens, S., van Vugt, R., Tilly, K., Rosa, P. A. und Stevenson, B.** (1997). Homology throughout the multiple 32-kilobase circular plasmids present in Lyme disease spirochetes. J. Bacteriol. **179**: 217-27.
- Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W. M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R. J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O. und Fraser, C. M.** (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. **35**: 190-516.
- Casjens, S.** (2001). *Borrelia* Genomes. The spirochetes: Molecular and cellular biology. Saier M. H. und Garcia-Lara J. Wymondham, UK, Horizon Scientific Press: 75-85.
- Casjens S.** (2001). *Borrelia* Genomes. The spirochetes: Molecular and cellular biology. Saier M. H. und Garcia-Lara J. Wymondham, UK, Horizon Scientific Press: 75-85.
- CDC** (1997). Case definitions for infectious conditions under public health surveillance: Lyme disease clinical description. MMWR **46**: 20-21.
- CDC** (2006). Reported cases of Lyme disease by year, United States, 1991-2006.
- China, B., Sory, M. P., N'Guyen, B. T., De Bruyere, M. und Cornelis, G. R.** (1993). Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. **61**: 3129-3136.
- Chung, K. M., Liszewski, M. K., Nybakken, G., Davis, A. E., Townsend, R. R., Fremont, D. H., Atkinson, J. P. und Diamond, M. S.** (2006). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 19111-6.
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schafer, S. M., Vitorino, L., Goncalves, L., Baptista, S., Vieira, M. L. und Cunha, C.** (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. J. Clin. Microbiol. **42**: 1316-8.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. und Deléage, G.** (2000). NPS@: Network protein sequence analysis. Trends Biochem. Sci. **25**: 147-50.
- Cordes, F. S., Roversi, P., Kraiczky, P., Simon, M. M., Brade, V., Jahraus, O., Wallis, R., Skerka, C., Zipfel, P. F., Wallich, R. und Lea, S. M.** (2005). A novel fold for the factor H-binding protein BbCRASP-1 of *Borrelia burgdorferi*. Nat. Struct. Mol. Biol. **12**: 276-7.

- Da Franca, I.** (2004). Infection by spirochetes of the *Borrelia burgdorferi* complex in Portugal. A dermatologic perspective and implication of *Borrelia lusitaniae*. Covilha, Universidade da Beira Interior.
- Da Franca, I., Santos, L., Mesquita, T., Collares-Pereira, M., Baptista, S., Vieira, L., Viana, I., Vale, E. und Prates, C.** (2005). Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. Wien. Klin. Wochenschr. **117**: 429-32.
- Das, R., Hegyi, H. und Gerstein, M.** (2001). Genome analyses of spirochetes: A study of the protein structures, functions and metabolic pathways in *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. The spirochetes: Molecular and cellular biology. Saier M. H. und Garcia-Lara J. Wymondham, UK, Horizon Scientific Press.
- Datta, P. K. und Rappaport, J.** (2006). HIV and complement: hijacking an immune defense. Biomedecine & Pharmacotherapy **60**: 561-8.
- De Carvalho, L. I., Fonseca, J. E., Marques, J. G., Ullmann, A., Hojgaard, A., Zeidner, N. und Nuncio, M. S.** (2008). Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection Clin. Rheumatol. **27**:1587-91
- De Michelis, S., Sewell, H.-S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L. M., Benes, V., Holmes, E. C. und Kurtenbach, K.** (2000). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. J. Clin. Microbiol. **38**: 2128-33.
- Deng, J., Gold, D., LoVerde, P. T. und Fishelson, Z.** (2003). Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. **71**: 6402-10.
- Diaz, A., Ferreira, A. und Sim, R. B.** (1997). Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. **158**: 3779-86.
- Diza, E., Papa, A., Vezyri, E., Tsounis, S., Milonas, I. und Antoniadis, A.** (2004). *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. Emerg. Infect. Dis. **10**: 1692-3.
- Dsouli, N., Younsi-Kabachii, H., Postic, D., Noura, S., Gern, L. und Bouattour, A.** (2006). Reservoir role of lizard *Psammotromus algirus* in transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Spirochaetaceae*) in Tunisia. J. Med. Entomol. **43**: 737-42.
- Dumler, J. S.** (2001). Molecular diagnosis of Lyme disease: review and metaanalysis. Mol. Diagn. **6**: 1-11.

- Dunn, J. J., Buchstein, S. R., Butler, L.-L., Fisenne, S., Polin, D. S., Lade, B. N. und Luft, B. J. (1994). Complete nucleotide sequence of a circular plasmid from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. **176**: 2706-17.
- El-Hage, N., Lieto, L. D. und Stevenson, B. (1999). Stability of *erp* loci during *Borrelia burgdorferi* infection: recombination is not required for chronic infection of immunocompetent mice. Infect. Immun. **67**: 3146-50.
- El-Hage, N., Babb, K., Carroll, J. A., Lindstrom, N., Fischer, E. R., Miller, J. C., Gilmore, R. D. J., Mbow, M. L. und Stevenson, B. (2001). Surface exposure and protease insensitivity of *Borrelia burgdorferi* Erp (OspEF-related) lipoproteins. Microbiology **147**: 821-30.
- Fingerle, V. und Wilske, B. (2007). Mikrobiologische Diagnostik der Lyme-Borreliose. J. Lab. Med. **31**: 141-8.
- Földvári, G., Farkas, R. und Lakos, A. (2005). *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. Emerg. Infect. Dis. **11**: 1794-5.
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K. und Nakao, M. (1996). *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. Microbiol. Immunol. **40**: 877-81.
- Gern, L., Hu, C. M., Kocianova, E., Vyrostekova, V. und Rehacek, J. (1999). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from Ixodes ricinus ticks collected in Slovakia. Eur. J. Epidemiol. **15**: 665-9.
- Grego, E., Bertolotti, L., Peletto, S., Amor, G. und Tomassone, L. (2007). *Borrelia lusitaniae* OspA gene heterogeneity in Mediterranean basin area. J. Mol. Evol. **65**: 512-8.
- Hartmann, K., Corvey, C., Skerka, C., Kirschfink, M., Karas, M., Brade, V., Miller, J. C., Stevenson, B., Wallich, R., Zipfel, P. F. und Kraiczy, P. (2006). Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1. Mol. Microbiol. **61**: 1220-36.
- Haupt, K., Kraiczy, P., Wallich, R., Brade, V., Skerka, C. und Zipfel, P. F. (2007). Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins. J. Infect. Dis. **196**: 134-44.

- Haupt, K., Reuter, M., van den Elsen, J., Burman, J., Hälbig, S., Richter, J., Skerka, C. und Zipfel, P. F.** (2008). The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. PLoS Pathog **4**: e100250.
- Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R. und Wilske, B.** (1997). Interpretation criteria for standardized western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. **35**: 1433-4.
- Hefty, P. S., Jolliff, S. E., Caimano, M. J., Wikel, S. K. und Akins, D. R.** (2002). Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. **70**: 3468-78.
- Hellwage, J., Jokiranta, S. T., Koistinen, V., Vaarala, O., Meri, S. und Zipfel, P. F.** (1999). Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. FEBS Lett. **462**: 345-52.
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I. J. und Meri, S.** (2001). The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. J. Biol. Chem. **276**: 8427-35.
- Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P. F., Wallich, R. und Kraiczy, P.** (2007). Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. Infect. Immun. **75**: 4817-25.
- Herzberger, P.** (2008). Vergleichende Untersuchungen zur Komplementresistenz von *B. spielmanii* sp. nov. und Rückfallfieber-Borrelien sowie Identifizierung und Charakterisierung des Faktor H und FHL-1 bindenden BsCRASP-1 Proteins. Fachbereich Medizin. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Humair, P. F., Peter, O., Wallich, R. und Gern, L.** (1995). Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. J. Med. Entomol. **32**: 433-8.
- Irigoín, F., Laich, A., Ferreira, A. M., C, F., C., Sim, R. B. und Díaz, A.** (2008). Resistance of the *Echinococcus granulosus* cyst wall to complement activation: analysis of the role of InsP₆ deposits. **30**: 354-64.

- Ishiguro, F., Takada, N., Yano, Y., Harada, M., Masuzawa, T. und Iida, H. (1995).** Prevalence of antibodies to *Borrelia spirochetes* among wild small rodents in central and western Japan. Microbiol. Immunol. **39**: 419-24.
- Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A. G., Pozzi, G. und Björck, L. (2000).** Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. **275**: 37257-63.
- Jarva, H., Jokiranta, T. S., Würzner, R. und Meri, S. (2003).** Complement resistance mechanisms of streptococci. Molecular Immunology **40**: 95-107.
- Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W., Steigerwalt, A. G. und Brenner, D. J. (1984).** *Borrelia-burgdorferi* sp-nov - etiologic agent of Lyme-disease. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 496-7.
- Johnsson, E., Berggard, K., Kotarsky, H., Hellwage, J., Zipfel, P. F., Sjöbring, U. und Lindahl, G. (1998).** Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: Binding of a human complement inhibitor. **161**: 4894-901.
- Jouda, F., Crippa, M., Perret, J.-L. und Gern, L. (2002).** Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland) Eur. J. Epidemiol. **18**: 907-12.
- Jouda, F., Perret, J.-L. und Gern, L. (2004a).** Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: Spatio-temporal pattern at a regional scale. Vector Borne Zoonotic Dis. **4**: 23-32.
- Jouda, F., Perret, J. L. und Gern, L. (2004b).** *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. J. Med. Entomol. **41**: 162-9.
- Józsi, M. und Zipfel, P. F. (2008).** Factor H family proteins and human diseases. Trends Immunol. **29**: 380-7.
- Kawabata, H., Masuzawa, T. und Yanagihara, Y. (1993).** Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiol. Immunol. **37**: 843-8.
- Kee, S. H., Yoon, J. H., Oh, H. B., Park, Y. H., Kim, Y. W., Cho, M. K., Park, K. S. und Chang, W. H. (1996).** Genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Korea using genomic hybridization and 16S rRNA gene sequence determination. Microbiol. Immunol. **40**: 599-605.

- Kenedy, M. R., Vuppala, S. R., Siegel, C., Kraiczy, P., Akins, D. R.** (2009). CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. **77**: 2773-82.
- Kochi, S. K. und Johnson, R. C.** (1988). Role of immunoglobulin G in killing of *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway. Infect. Immun. **56**: 314-21.
- Kotarsky, H., Hellwage, J., Johnsson, E., Skerka, C., Svensson, H. G., Lindahl, G., Sjöbring, U. und Zipfel, P. F.** (1998). Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein-1 required for the interaction with streptococcal M proteins 1. J. Immunol. **160**: 3349-54.
- Kraiczy, P., Hunfeld, K. P., Breitner-Ruddock, S., Würzner, R., Acker, G. und Brade, V.** (2000). Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates. Immunobiology **201**: 406-19.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V. und Zipfel, P. F.** (2001a). Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. **69**: 7800-9.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V. und Zipfel, P. F.** (2001b). Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. Eur. J. Immunol. **31**: 1674-84.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P. F. und Brade, V.** (2001c). Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. Int. Immunopharmacol. **1**: 393-401.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Zipfel, P. F. und Brade, V.** (2002). Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: a new protein family involved in complement resistance. Wien. Klin. Wochenschr. **114**: 568-73.
- Kraiczy, P., Hellwage, J., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P. F. und Wallich, R.** (2003). Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family. Eur. J. Immunol. **33**: 697-707.
- Kraiczy, P.** (2004). Natürliche Komplementresistenz und humorale Immunabwehr bei *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose. Aachen, Shaker Verlag.
- Kraiczy, P., Hartmann, K., Hellwage, J., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P. F., Wallich, R. und Stevenson, B.** (2004). Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*. Int. J. Med. Microbiol. **293**: 152-7.

- Kraiczy, P. und Würzner, R.** (2006). Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. Mol. Immunol. **43**: 31-44.
- Kraiczy P., Acker G. und Brade V.** (1998). Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. Bremen, Germany, UNI-MED Verlag.
- Kudryashev, M., Cyrklaff, M., Baumeister, W., Simon, M. M., Wallich, R. und Frischknecht, F.** (2009). Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. **71**: 1415-34.
- Kunert, A., Losse, J., Gruszyn, C., Huhn, M., Kaendler, K., Mikkat, S., Volke, D., Hoffmann, R., Jokiranta, T. S., Seeberger, H., Moellmann, U., Hellwage, J. und Zipfel, P. F.** (2007). Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. **179**: 2979-88.
- Kurtenbach, K., Sewell, H.-S., Ogden, N. H., Randolph, S. E. und Nuttall, P. A.** (1998). Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. Infect. Immun. **66**: 1248-1251.
- Lam, T. T., Nguyen, T. P., Montgomery, R. R., Kantor, F. S., Fikrig, E. und Flavell, R. A.** (1994). Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. Infect. Immun. **62**: 290-8.
- Lambris, J. D., Ricklin, D. und Geisbrecht, B. V.** (2008). Complement evasion by human pathogens. Nat. Rev. Micro. **6**: 132-42.
- Lardieri, G., Salvi, A., Camerini, F., Cinco, M. und Trevisan, G.** (1993). Isolation of *Borrelia burgdorferi* from myocardium. Lancet **342**: 490.
- Law, S. K. A. und Reid, K. B.** (1995). Complement 2nd edition. Oxford, UK, IRL press.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O. und Baranton, G.** (1997). Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 921-5.
- Logigian, E. L., Kaplan, R. F. und Steere, A. C.** (1990). Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. N. Engl. J. Med. **323**: 1438-44.
- Loos, M. und Clas, F.** (1987). Antibody-independent killing of gram-negative bacteria via the classical pathway of complement. Immunol. Lett. **14**: 203-8.
- Lupas, A., van Dyke, M. und Stock, J.** (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. Science **252**: 1162-4.

- Majláthová, V., Majláth, I., Derdáková, M., Víchová, B. und Pet'ko, B.** (2006). *Borrelia lusitaniae* and green lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. Emerg. Infect. Dis. **12**: 1895-901.
- Majláthová, V., Majláth, I., Hromada, M., Tryjanowski, P., Bona, M., Antczak, M., Víchová, B., Dzimko, S., Mihalca, A. und Petko, B.** (2008). The role of the sand lizard (*Lacerta agilis*) in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Int. J. Med. Microbiol. In Press, Corrected Proof.
- Marconi, R. T., Liveris, D. und Schwartz, I.** (1995). Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J. Clin. Microbiol. **33**: 2427-34.
- Margos, G., Vollmer, S. A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., Kurtenbach, K.** (2009). A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. Appl. Environ. Microbiol. **75**: 5410-6.
- Masuzawa, T., Suzuki, H., Kawabata, H., Ishiguro, F., Takada, N. und Yanagihara, Y.** (1996). Characterization of *Borrelia* spp. isolated from the tick, *Ixodes tanuki* and small rodents in Japan. J. Wildl. Dis. **32**: 565-71.
- Masuzawa, T., Fukui, T., Miyake, M., Oh, H.-B., Cho, M.-K., Chang, W.-H., Imai, Y. und Yanagihara, Y.** (1999). Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from *Ixodes nipponensis* in Korea as *Borrelia valaisiana*. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**: 1409-15.
- Masuzawa, T., Pan, M. J., Kadosaka, T., Kudeken, M., Takada, N., Yano, Y., Imai, Y. und Yanagihara, Y.** (2000). Characterization and identification of *Borrelia* isolates as *Borrelia valaisiana* in Taiwan and Kinmen Islands. Microbiol. Immunol. **44**: 1003-9.
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y. und Ezaki, T.** (2001). *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 1817-24.
- McDowell, J. V., Sung, S. Y., Price, G. und Marconi, R. T.** (2001). Demonstration of the genetic stability and temporal expression of select members of the lyme disease spirochetes OspF Protein family during infection in mice. Infect. Immun. **69**: 4831-8.

- McDowell, J. V., Wolfgang, J., Tran, E., Metts, M. S., Hamilton, D. und Marconi, R. T.** (2003). Comprehensive analysis of the factor H binding capabilities of borrelia species associated with lyme disease: delineation of two distinct classes of factor H binding proteins. Infect. Immun. **71**: 3597-602.
- McDowell, J. V., Wolfgang, J., Senty, L., Sundy, C. M., Noto, M. J. und Marconi, R. T.** (2004). Demonstration of the involvement of outer surface protein E coiled coil structural domains and higher order structural elements in the binding of infection-induced antibody and the complement regulatory protein, factor H. J. Immunol. **173**: 7471-80.
- McRae, J. L., Duthy, T. H., Griggs, K. M., Ormsby, R. J., Cowan, P. J., Cromer, B. A., McKinstry, W. J., Parker, M. W., Murphy, B. F. und Gordon, D. L.** (2005). Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein1. J. Immunol. **174**: 6250-6.
- Mehnert, W. H. und Krause, G.** (2005). Surveillance of Lyme borreliosis in Germany, 2002 and 2003. Euro. Surveill. **10**: 531-8.
- Melski, J. W., Reed, K. D., Mitchell, P. D. und Barth, G. D.** (1993). Primary and secondary erythema migrans in central Wisconsin. Arch. Dermatol. **129**: 709-16.
- Meri, T., Hartmann, A., Lenk, D., Eck, R., Wurznier, R., Hellwage, J., Meri, S. und Zipfel, P. F.** (2002a). The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. **70**: 5185-92.
- Meri, T., Jokiranta, T. S., Hellwage, J., Bialonski, A., Zipfel, P. F. und Meri, S.** (2002b). *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. **185**: 1786-93.
- Meri, T., Blom, A. M., Hartmann, A., Lenk, D., Meri, S. und Zipfel, P. F.** (2004). The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. **72**: 6633-41.
- Metts, M. S., McDowell, J. V., Theisen, M., Hansen, P. R. und Marconi, R. T.** (2003). Analysis of the OspE determinants involved in binding of factor H and OspE-targeting antibodies elicited during *Borrelia burgdorferi* infection in mice. Infect. Immun. **71**: 3587-96.
- Miller, J., Bono, J., Babb, K., El-Hage, N., Casjens, S. und Stevenson, B.** (2000). Identification of cp9-2, a previously undetected, naturally-occurring circular plasmid of *Borrelia burgdorferi* strain B31. J. Bacteriol.

- Nadelman, R. B. und Wormser, G. P.** (1998). Lyme borreliosis. Lancet **352**: 557-65.
- Oschmann, P., Dorndorf, W., Hornig, C., Schäfer, C., Wellesiek, H. J. und Pflughaupt, K. W.** (1998). Stages and syndromes of neuroborreliosis. J. Neurol. **245**: 262-72.
- Oschmann, P. und Kraiczy, P.** (1998). Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. Bremen, Germany, UNI-MED Verlag.
- Paster, B. J. und Dewhirst, F. E.** (2001). Phylogenetic foundation of spirochetes. The spirochetes: Molecular and cellular biology. M. H. Saier und J. Garcia-Lara. Wymondham, UK, Horizon Scientific Press: 5-9.
- Picken, R. N., Cheng, Y., Strle, F. und Picken, M. M.** (1996). Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. J. Infect. Dis. **174**: 1112-5.
- Picken, R. N., Strle, F., Ruzic-Sabljic, E., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Cimperman, J., Cheng, Y. und Picken, M. M.** (1997). Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from five patients with solitary lymphocytoma. J. Invest. Dermatol. **108**: 92-7.
- Piesman, J.** (1993). Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. J. Infect. Dis. **167**: 1082-5.
- Pintér, C., Siccardi, A. G., Lopalco, L., Longhi, R. und Clivio, A.** (1995). HIV glycoprotein 41 and complement factor H interact with each other and share functional as well as antigenic homology. AIDS Res. Hum. Retroviruses **11**: 971-80.
- Poland, G. A. und Jacobson, R. M.** (2001). The prevention of Lyme disease with vaccine. Vaccine **19**: 2303-8.
- Poltermann, S., Kunert, A., von der Heide, M., Eck, R., Hartmann, A. und Zipfel, P. F.** (2007). Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. **282**: 37537-44.
- Postic, D., Ras, N. M., Lane, R. S., Henderson, M. und Baranton, G.** (1998). Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). J. Clin. Microbiol. **36**: 3497-504.
- Postic, D., Garnier, M. und Baranton, G.** (2007). Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates - Description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. Int. J. Med. Microbiol. **297**: 263-71.

- Poupon, M.-A., Lommano, E., Humair, P.-F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, L. und Gern, L.** (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 976-9.
- Prodinger, W. M., Hellwage, J., Spruth, M., Dierich, M. P. und Zipfel, P. F.** (1998). The C-terminus of factor H: monoclonal antibodies inhibit heparin binding and identify epitopes common to factor H and factor H-related proteins. Biochem. J. **331**: 41-7.
- Ram, S., McQuillen, D. P., Gulati, S., Elkins, C., Pangburn, M. K. und Rice, P. A.** (1998a). Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: A molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. **188**: 671-80.
- Ram, S., Sharma, A. K., Simpson, S. D., Gulati, S., McQuillen, D. P., Pangburn, M. K. und Rice, P. A.** (1998b). A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. J. Exp. Med. **187**: 743-52.
- Ram, S., Sharma, A. K., Simpson, S. D., Gulati, S., McQuillen, D. P., Pangburn, M. K. und Rice, P. A.** (1998c). A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. **187**: 743-52.
- Rautemaa, R., Jarvis, G. A., Marnila, P. und Meri, S.** (1998). Acquired resistance of *Escherichia coli* to complement lysis by binding of glycosphosphoinositol-anchored protectin (CD59). **66**: 1928-33.
- Rautemaa, R., Rautelin, H., Puolakkainen, P., Kokkola, A., Karkkainen, P. und Meri, S.** (2001). Survival of *Helicobacter pylori* from complement lysis by binding of GPI-anchored protectin (CD59). Gastroenterology **120**: 470-9.
- Rebaudet, S. und Parola, P.** (2006). Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **48**: 11-5.
- Reed, K. D.** (2002). Laboratory testing for Lyme Disease: Possibilities and practicalities. J. Clin. Microbiol. **40**: 319-24.
- Richter, D., Schlee, D. B. und Matuschka, F.-R.** (2003). Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of lyme disease agent. Emerg. Infect. Dis. **9**: 697-701
- Richter, D., Schlee, D. B., Allgöwer, R. und Matuschka, F.-R.** (2004). Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmanii* sp. nov., with its hosts in Central Europe. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 6414-9.
- Richter, D. und Matuschka, F.-R.** (2006). Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 4627-32.

- Rijpkema, S. G., Tazelaar, D. J., Molkenboer, M. J., Noordhoek, G. T., Plantinga, G., Schouls, L. M. und Schellekens, J. F.** (1997). Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin. Microbiol. Infect. **3**: 109-16.
- Robert Koch Institut** (2005). Neuerkrankungen an Lyme-Borreliose im Jahr 2004. Epid. Bull. **32**.
- Robert Koch Institut** (2007). Lyme-Borreliose. Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte.
- Robertson, J., Guy, E., Andrews, N., Wilske, B., Anda, P., Granstrom, M., Hauser, U., Moosmann, Y., Sambri, V., Schellekens, J., Stanek, G. und Gray, J.** (2000). A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. **38**: 2097-102.
- Rogers, E. A. und Marconi, R. T.** (2007). Delineation of species-specific binding properties of the CspZ protein (BBH06) of Lyme disease spirochetes: Evidence for new contributions to the pathogenesis of *Borrelia* spp. Infect. Immun. **75**: 5272-81.
- Rosa, P. A., Tilly, K. und Stewart, P. E.** (2005). The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. Nat. Rev. Micro. **3**: 129-43.
- Rossmann, E., Kraiczy, P., Herzberger, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Simon, M. M., Zipfel, P. F. und Wallich, R.** (2007). Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. **178**: 7292-301.
- Rothermel, H., Hedges, T. R. I. und Steere, A. C.** (2001). Optic neuropathy in children with Lyme disease. Pediatrics **108**: 477-81.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. und Oliver, J. H. J.** (2008). *Borrelia carolinensis* sp. nov. - a new (14th) member of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern United States. J. Clin. Microbiol. **47**: 134-41.
- Ryffel, K., Peter, O., Rutti, B., Suard, A. und Dayer, E.** (1999). Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. J. Clin. Microbiol. **37**: 4086-92.

- Sarih, M. H., Jouda, F., Gern, L. und Postic, D.** (2003). First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. Vector Borne Zoonotic Dis. **3**: 133-9.
- Schwartz, I., Wormser, G. P., Schwartz, J. J., Cooper, D., Weissensee, P., Gazumyan, A., Zimmermann, E., Goldberg, N. S., Bittker, S., Campbell, G. L. und Pavia, C. S.** (1992). Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions. J. Clin. Microbiol. **30**: 3082-8.
- Siegel, C., Schreibert, J., Haupt, K., Skerka, C., Brade, V., Simon, M. M., Stevenson, B., Wallich, R., Zipfel, P. F. und Kraiczy, P.** (2008). Deciphering the ligand-binding sites in the *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 2 required for interactions with the human immune regulators factor H and factor H-like protein 1. J. Biol. Chem. **283**: 34855–63.
- Smith, R., Takkinen, J. und Team, E.** (2006). Lyme borreliosis: Europe-wide coordinated surveillance and action needed? Euro. Surveill. **11**: 2977-9.
- Stanek, G., Klein, J., Bittner, R. und Glogar, D.** (1990). Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. N. Engl. J. Med. **322**: 249-52.
- Steere, A. C., Malawista, S. E., Snyderman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R. und Steele, F. M.** (1977). Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. Arthritis Rheum. **20**: 7-17.
- Steere, A. C.** (1989). Lyme disease. N. Engl. J. Med. **321**: 586-96.
- Steere, A. C.** (2001). Lyme disease. N. Engl. J. Med. **345**: 115-25.
- Stevenson, B., Schwan, T. G. und Rosa, P. A.** (1995). Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. **63**: 4535-9.
- Stevenson, B., Casjens, S., van Vugt, R., Porcella, S. F., Tilly, K., Bono, J. L. und Rosa, P.** (1997). Characterization of cp18, a naturally truncated member of the cp32 family of *Borrelia burgdorferi* plasmids. J. Bacteriol. **179**: 4285-91.
- Stevenson, B., El-Hage, N., Hines, M. A., Miller, J. C. und Babb, K.** (2001a). Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. Infect. Immun. **70**: 491-7.

- Stevenson, B., Zückert, W. R. und Akins, D. R.** (2001b). Repetition, conservation and variation: the multiple cp32 plasmids of *Borrelia* species. The spirochetes: Molecular and cellular biology. M. H. Saier und J. Garcia-Lara (Eds.). Wymondham, UK, Horizon Scientific Press: 87-100.
- Stevenson, B.** (2002). *Borrelia burgdorferi* *erp* (*ospE*-related) gene sequences remain stable during mammalian infection. Infect. Immun. **70**: 5307-11.
- Stevenson, B. und Miller, J. C.** (2003). Intra- and interbacterial genetic exchange of Lyme disease spirochete *erp* genes generates sequence identity amidst diversity. J. Mol. Evol. **57**: 309-24.
- Stevenson, B., Bykowski, T., Cooley, A., Babb, K., Miller, J. C., Woodman, M. E., von Lackum, K. und Riley, S. P.** (2006). The Lyme disease spirochete Erp protein family: Structure, function and regulation of expression. Molecular biology of spirochetes, Cabello F. C. et al. (Eds.).
- Stewart, P. E., Thalken, R., Bono, J. L. und Rosa, P.** (2001). Isolation of a circular plasmid region sufficient for autonomous replication and transformation of infectious *Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. **39**: 714-21.
- Stoiber, H., Clivio, A. und Dierich, M. P.** (1997). Role of complement in HIV infection. **15**: 649-74.
- Strle, F., Picken, R. N., Cheng, Y., Cimperman, J., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Ruzic-Sabljić, E. und Picken, M. M.** (1997). Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. Clin. Infect. Dis. **25**: 273-80.
- Strle, F., Nadelman, R. B., Cimperman, J., Nowakowski, J., Picken, R. N., Schwartz, I., Maraspin, V., Aguero-Rosenfeld, M. E., Varde, S., Lotric-Furlan, S. und Wormser, G. P.** (1999). Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. Ann. Intern. Med. **130**: 32-6.
- Sung, S. Y., McDowell, J. V., Carlyon, J. A. und Marconi, R. T.** (2000). Mutation and recombination in the upstream homology box-flanked *ospE*-related genes of the Lyme disease spirochetes results in the development of new antigenic variants during infection. Infect. Immun. **68**: 1319-27.

- Van Dam, A. P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B. M., Spanjaard, L., Ramselaar, A. C., Kramer, M. D. und Dankert, J.** (1993). Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin. Infect. Dis. **17**: 708-17.
- Van Dam, A. P., Oei, A., Jaspars, R., Fijen, C., Wilske, B., Spanjaard, L. und Dankert, J.** (1997). "Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease." Infect. Immun. **65**(4): 1228-36.
- Vitorino, L. R., Margos, G., Feil, E. J., Collares-Pereira, M., Zé-Zé, L. und Kurtenbach, K.** (2008). Fine-scale phylogeographic structure of *Borrelia lusitaniae* revealed by multilocus sequence typing. PLoS ONE **3**: e4002.
- Vogl, G., Lesiak, I., Jensen, D. B., Perkhofer, S., Eck, R., Speth, C., Lass-Flörl, C., Zipfel, P. F., Blom, A. M., Dierich, M. P. und Würzner, R.** (2008). Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: The mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein. Molecular Immunology **45**: 1485-93.
- Wallich, R., Pattathu, J., Kitiratschky, V., Brenner, C., Zipfel, P. F., Brade, V., Simon, M. M. und Kraiczy, P.** (2005). Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. Infect. Immun. **73**: 2351-9.
- Walport, M. J.** (2001). Complement- first of two parts. N. Engl. J. Med. **344**: 1058-66.
- Wang, G., van Dam, A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., De Boer, R., Spanjaard, L. und Dankert, J.** (1997). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 926-32.
- Wang, G., van Dam, A. P. und Dankert, J.** (1999a). Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. **37**: 3025-8.
- Wang, G., van Dam, A. P., Schwartz, I. und Dankert, J.** (1999b). "Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications." Clin. Microbiol. Rev. **12**(4): 633-53.
- Wilske, B., Fingerle, V. und Schulte-Spechtel, U.** (2007). Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **49**: 13-21.
- Wormser, G. P., Bittker, S., Cooper, D., Nowakowski, J., Nadelman, R. B. und Pavia, C.** (2000). Comparison of the yields of blood cultures using serum or plasma from patients with early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. **38**: 1648-50.

- Younsi, H., Postic, D., Baranton, G. und Bouattour, A.** (2001). High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. Eur. J. Epidemiol. **17**: 53-6.
- Younsi, H., Sarih, M. H., Jouda, F., Godfroid, E., Gern, L., Bouattour, A., Baranton, G. und Postic, D.** (2005). Characterization of *Borrelia lusitaniae* isolates collected in Tunisia and Morocco. J. Clin. Microbiol. **43**: 1587-93.
- Zeidner, N. S., Nuncio, M. S., Schneider, B. S., Gern, L., Piesman, J., Brandao, O. und Filipe, A. R.** (2001). A Portuguese isolate of *Borrelia lusitaniae* induces disease in C3H/HeN mice. J. Med. Microbiol. **50**: 1055-60.
- Zhioua, E., Bouattour, A., Hu, C. M., Gharbi, M., Aeschliman, A., Ginsberg, H. S. und Gern, L.** (1999). Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. J. Med. Entomol. **36**: 216-8.
- Zipfel, P. F. und Skerka, C.** (1994). Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? Immunol. Today **15**: 121-6.
- Zipfel, P. F. und Skerka, C.** (1999). FHL-1/reconnectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. Immunol. Today **20**: 135-40.
- Zipfel, P. F., Skerka, C., Hellwage, J., Jokiranta, S. T., Meri, S., Brade, V., Kraiczy, P., Noris, M. und Remuzzi, G.** (2002). Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. Biochem. Soc. Trans. **30**: 971-8.
- Zipfel, P. F., Heinen, S., Józsi, M. und Skerka, C.** (2006). Complement and diseases: Defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. Mol. Immunol. **43**: 97-106.
- Zückert, W. R., Kerentseva, T. A., Lawson, C. L. und Barbour, A. G.** (2001). Structural conservation of neurotropism-associated VspA within the variable *Borrelia* Vsp-OspC lipoprotein family. J. Biol. Chem. **276**: 457-63.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
ACP	American college of physicians
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-Benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid
APS	Ammoniumpersulfat
AV-Block	atrio-ventrikulärer Block
Ba	<i>Borrelia afzelii</i>
Bac	<i>Streptococcus agalactiae</i> C β protein
Bb	<i>Borrelia burgdorferi</i>
Bg	<i>Borrelia garinii</i>
bidest.	bidestilliert
Bl	<i>Borrelia lusitaniae</i>
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
Bs	<i>Borrelia spielmanii</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
C	Cytosin
C4BP	C4 binding protein
ca.	circa
CBA	Colorimetrischer Bakterizidie Assay
CD	cluster of differentiation
CDC	centers for disease control and prevention
cp	circular plasmid
CR	Complement receptor
CRASP	complement regulator-acquiring surface protein
CRP	C-reaktives Protein
DAF	decay-accelerating factor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Erythema chronicum migrans
Erp	OspE/F related protein
et al.	et alii
Fa.	Firma
FHL	Factor H-like protein
FHR	Factor H-related protein
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
Gal	Galaktose
gp	Glycoprotein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTQ	gentechnologische Qualität

h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hic	factor H-binding inhibitor of complement
hiNHS	hitzeinaktiviertes normales Humanserum
Hsp	heat shock protein
IFA	indirekter Immunfluoreszenztest
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
J.	Jahre
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Broth
LOS	Lipooligosaccharid
lp	linear llasmid
Lsg.	Lösung
MAC	Membranangriffskomplex
MASP	mannose-binding lectin assoziierte Serinprotease
max.	maximal
MBL	mannose-binding lectin
MCP	membrane cofactor protein
min	Minuten
MW	Molekulargewicht
NHS	normales Humanserum
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
Osp	outer surface protein
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pgf	paralogous gene family
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
resp.	respektive
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunden
s.	siehe
s.l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto
SCR	Short Consensus Repeat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SOPMA	self-optimized prediction method with alignment
sp. nov.	species nova
spp.	Spezies
SSC	standard saline citrate
T	Thymin
T/T	Tris/Tricin
Tab.	Tabelle
TCC	terminal complement complex

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
ÜNK	Übernachtskultur
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
YT	yeast tryptone

8. Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung		
Abb. 1.1	Elektronenmikroskopische Bilder von Borrelien	4
Abb. 1.2	Schematischer Querschnitt einer Borrelienzelle	4
Abb. 1.3	Phylogenetischer Stammbaum der Borrelien	13
Abb. 1.4	Geographisches Vorkommen von <i>B. lusitaniae</i> in Europa	14
Abb. 1.5	Ablauf der Komplementkaskade	19
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der Komplementinhibition durch Faktor H und Faktor I	20
Abb. 1.7	Aufbau der Proteine der Faktor H-Familie	21
Abb. 1.8	Verlauf der Expression von CRASPs zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionszyklus Zecke-Wirt	23
Abb. 1.9	Phylogramm der Erp-Proteinfamilie anhand der Aminosäuresequenz	25
2. Material und Methoden		
Abb. 2.1	Vektorkarten nach Angaben des Herstellers	31
Abb. 2.2	Schematische Darstellung des ELISA	49
3. Ergebnisse		
Abb. 3.1	Gelelektrophoretische Analyse des Proteinexpressionsprofils von <i>B. lusitaniae</i> -Isolaten	62
Abb. 3.2	Nachweis der Serumempfindlichkeit von <i>B. lusitaniae</i>	64
Abb. 3.3	Negativer Nachweis der Ablagerung von Komplement nach Inkubation von Borrelienzellen mit hitzeinaktiviertem NHS	66
Abb. 3.4	Nachweis der Ablagerung aktivierter Komplementkomponenten auf Borrelienzellen	67
Abb. 3.5	Nachweis von abgelagerten C3-Fragmenten nach Opsonisierung von <i>B. lusitaniae</i> in NHS, NHS-EGTA und NHS-EDTA	69
Abb. 3.6	Identifikation von Faktor H-bindenden Proteinen bei <i>B. lusitaniae</i>	71
Abb. 3.7	Nachweis der Bindung von Proteinen der Faktor H-Familie an intakte Borrelienzellen	72
Abb. 3.8	Nachweis der Kofaktoraktivität von an <i>B. lusitaniae</i> gebundenem Faktor H	74
Abb. 3.9	Amplifikation <i>erp</i> -homologer Gensequenzen von <i>B. lusitaniae</i> MT-M6 mittels PCR	75
Abb. 3.10	Restriktionsanalyse verschiedener Insert-tragender Plasmide	77
Abb. 3.11	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des BICRASP-3 kodierenden Gens von <i>B. lusitaniae</i> MT-M8	78
Abb. 3.12	Homologievergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Erp-Proteine mit BICRASP-3 (MT-M8)	79
Abb. 3.13	Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Erp-Proteine	79
Abb. 3.14	Restriktionsanalyse des BICRASP-3 kodierenden Gens vor und nach Restriktion mit BamHI und XhoI	80
Abb. 3.15	Bindung von Faktor H, FHL-1 und FHR-1 an verschiedene CRASP-Proteine	81
Abb. 3.16	Bindungsverhalten von Faktor H an verschiedene CRASP-Proteine	82

Abb. 3.17	Nachweis der Kofaktoraktivität von an gereinigtem BICRASP-3 gebundenen Faktor H	83
Abb. 3.18	Lokalisierung der Interaktionsdomäne zwischen BICRASP-3 und Faktor H	84
Abb. 3.19	Nachweis der Membranständigkeit des BICRASP-3 Proteins von <i>B. lusitaniae</i> MT-M8	85
Abb. 3.20	Amplifikation orthologer Gensequenzen des BICRASP-3 (MT-M8) kodierenden Gens bei verschiedenen <i>B. lusitaniae</i> -Isolaten mittels PCR	86
Abb. 3.21	Homologievergleich der Aminosäuresequenz verschiedener BICRASP-3 orthologer Proteine von <i>B. lusitaniae</i>	87
Abb. 3.22	Homologievergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Erp-orthologer Proteine von <i>B. lusitaniae</i>	88
Abb. 3.23	Phylogenetischer Stammbaum verschiedener ErpL/Y-orthologer Proteine von <i>B. lusitaniae</i>	89
Abb. 3.24	Analyse des Plasmidprofils von <i>B. lusitaniae</i>	90
Abb. 3.25	Nachweis <i>erp</i> -homologer Gensequenzen bei <i>B. lusitaniae</i>	92
4. Diskussion		
Abb. 4.1	Struktur des <i>B. lusitaniae</i> CRASP-3 Proteins	103
Abb. 4.2	Vorhersage potentieller coiled-coil Motive im BICRASP-3-Molekül	104
Anhang		
Abb. A1	Nachweis der Serumempfindlichkeit von <i>B. lusitaniae</i>	i-ii
Abb. A2	Nachweis der Ablagerung aktivierter Komplementkomponenten auf Borrelienzellen	iii-v

8.2 Tabellenverzeichnis

1. Einleitung		
Tab. 1.1	Systematik der Gattung <i>Borrelia</i>	1
Tab. 1.2	Charakteristika der Spirochetaceae und Borrelien	2
Tab. 1.3	Klassifizierung der Lyme- und Rückfallfieberborrelien	2
Tab. 1.4	Pathogenität, Verbreitungsgebiet und Reservoir der Lyme-Borrelien	3
Tab. 1.5	Mittlere Sensitivität und Spezifität des Nachweises von Borrelien-DNA aus verschiedenen Materialien mittels PCR	10
Tab. 1.6	Empfehlungen zur Behandlung der Lyme-Borreliose	10
Tab. 1.7	Medikamente in der Behandlung der Lyme-Borreliose	11
Tab. 1.8	Übersicht über die Funktionen des Komplementsystems und beteiligte Proteine	17
Tab. 1.9	Aktivierung der Komplementkaskade	17
2. Material und Methoden		
Tab. 2.1	Für die Westernblot-Analyse verwendete Antikörper	44
Tab. 2.2	Für die Ligandenaffinitätsblot-Analyse verwendete Antikörper	44
Tab. 2.3	Für die Lokalisierung der Bindungsdomäne von Faktor H, FHL-1, FHR-1 und Faktor H-Fragmenten an BICRASP-3 verwendete Liganden und Antikörper	45
Tab. 2.4	Pipettierschema des Protease-Assay	48
3. Ergebnisse		
Tab. 3.1	Ermittelte Plasmidgrößen verschiedener <i>B. lusitaniae</i> -Isolate	91
4. Diskussion		
Tab. 4.1	Aminosäuresequenzvergleich verschiedener Faktor H-bindender Erp-Proteine	102

9. Internetadressen

SOPMA	http://pbil.ibcp.fr/NPSA.html
COILS	http://www.ch.embnet.org/software/Coils_form.html

10. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. phil. nat. Peter Kraiczy, der mir diese thematisch und praktisch spannende Arbeit ermöglichte und dabei stets freundlich mit Rat und Tat, Diskussionsbereitschaft, Ermunterung und Geduld präsent war.

Dank gilt auch Hr. Prof. Dr. med. Volker Brade, ehemals Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, der mir ermöglichte unter besten Arbeitsbedingungen meine Doktorarbeit an seinem Institut zu beginnen sowie

Hr. Prof. Dr. med. Volkhard A. J. Kempf, Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, der mir ebenso selbstverständlich gestattete, meine Arbeit abzuschließen.

Ich danke ebenfalls sehr Fr. Dr. Dania Richter und Hr. Dr. Franz-Rainer Matuschka für die Bereitstellung der *B. lusitaniae*-Isolate und die gute Zusammenarbeit sowie Hr. Prof. Dr. P. F. Zipfel, Hr. Prof. Dr. R. Wallich und Hr. Prof. Dr. A. P. van Dam für die Bereitstellung von weiteren Materialien.

Ich möchte mich desweiteren herzlich bei meiner Mitdoktorandin Dipl. Biol. Corinna Siegel bedanken, die mich anleitete und mir freundschaftlich stets fröhlich, aufmunternd und diskussionsfreudig zur Seite stand und mir auf vielfältige Weise immer die Freude an der Arbeit aufrechterhalten hat.

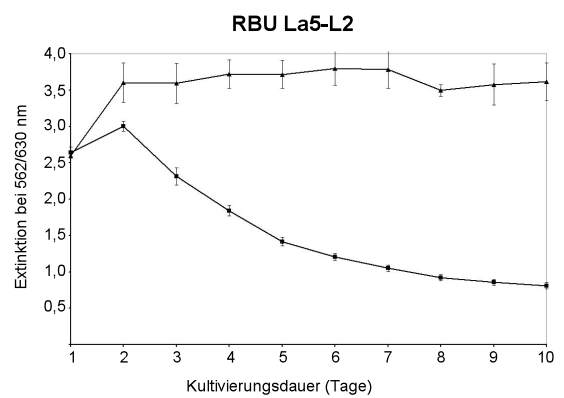
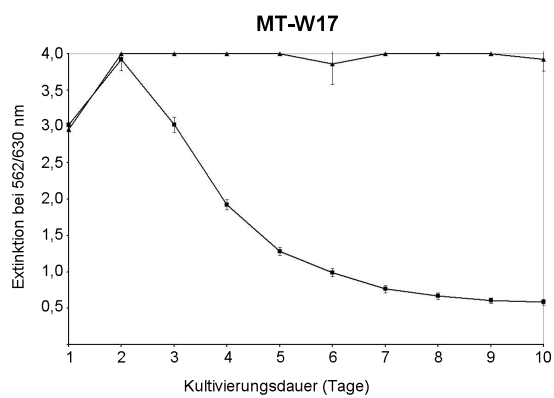
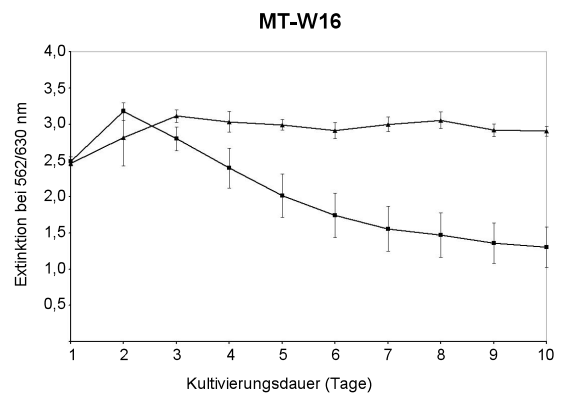
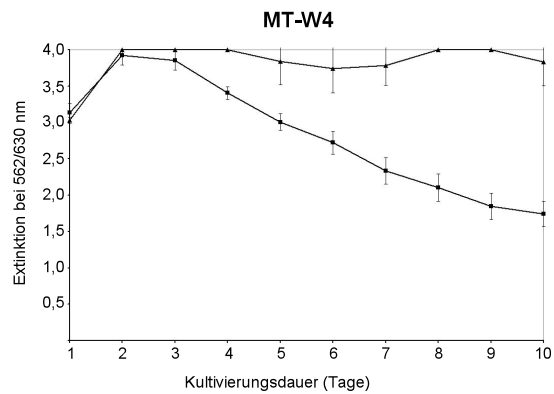
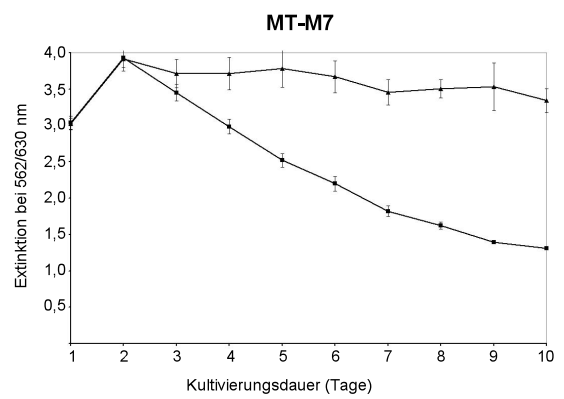
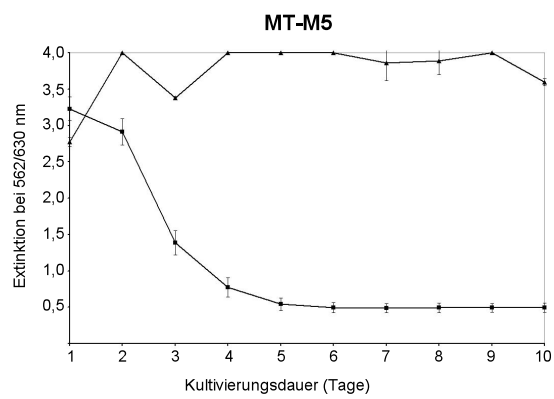
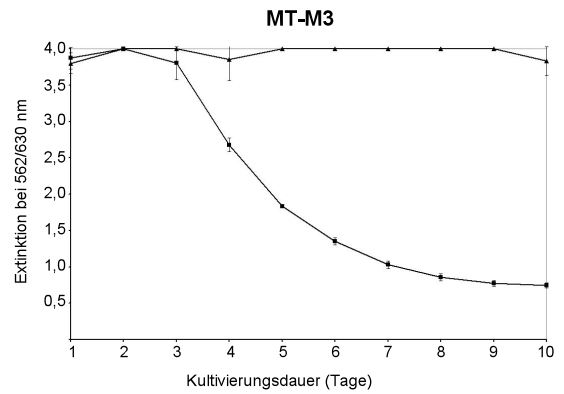
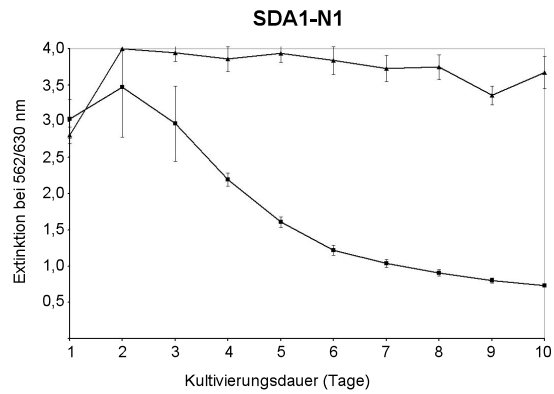
Ebenso bedanke ich mich bei Fr. Christa Hanssen-Hübner für die stets kompetente und freundliche Anleitung und Unterstützung.

Einen großen Dank möchte ich auch dem ganzen Laborteam aussprechen, die gemeinsam eine tolle Atmosphäre schufen und die Zeit nicht nur mit geistlicher Nahrung versüßten.

Ich danke außerdem herzlich meinem Freund Tim, der liebe- und anteilnahmsvoll die Zeit dieser Arbeit mit mir durchlebt hat.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die stets ein offenes Ohr hatten für meine Begeisterung, aber auch meine Probleme und mich immer unterstützt haben, allen voran meine Eltern, ohne die diese Arbeit und mein ganzes Studium nicht möglich gewesen wäre.

Anhang



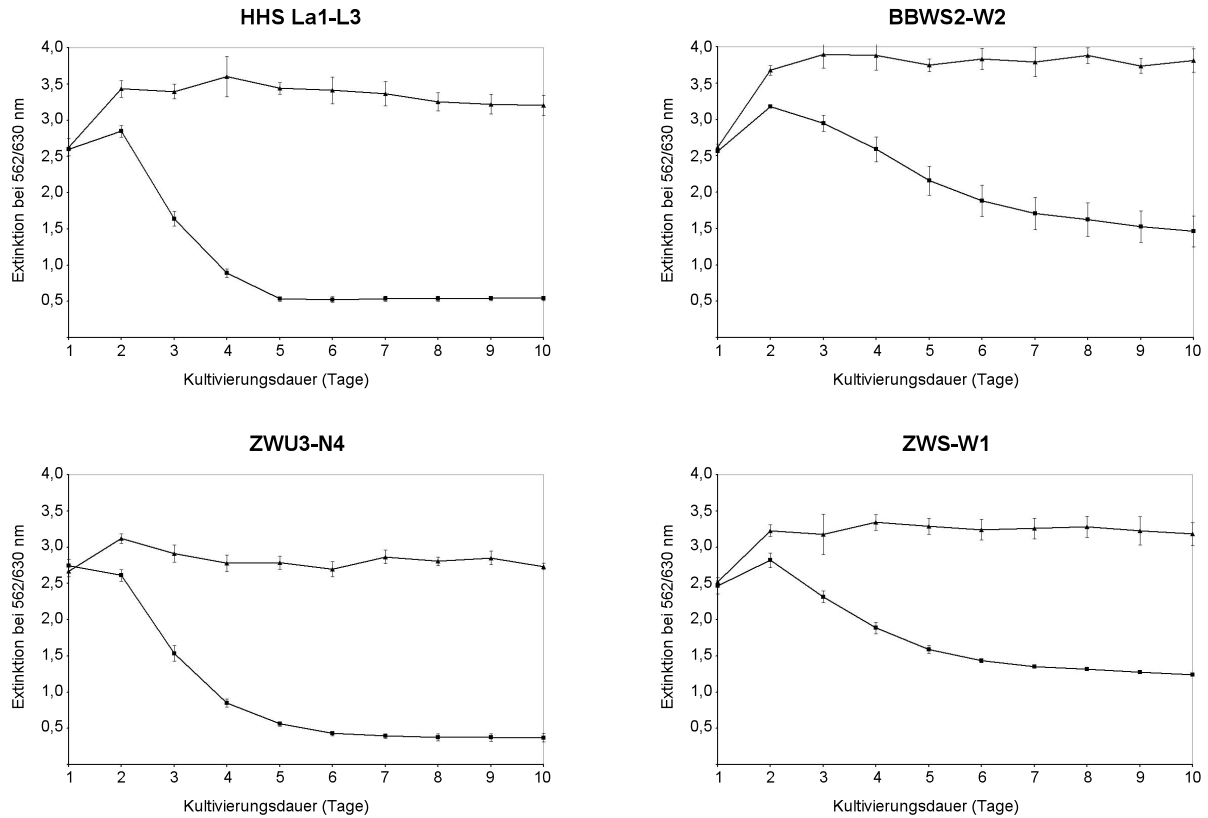
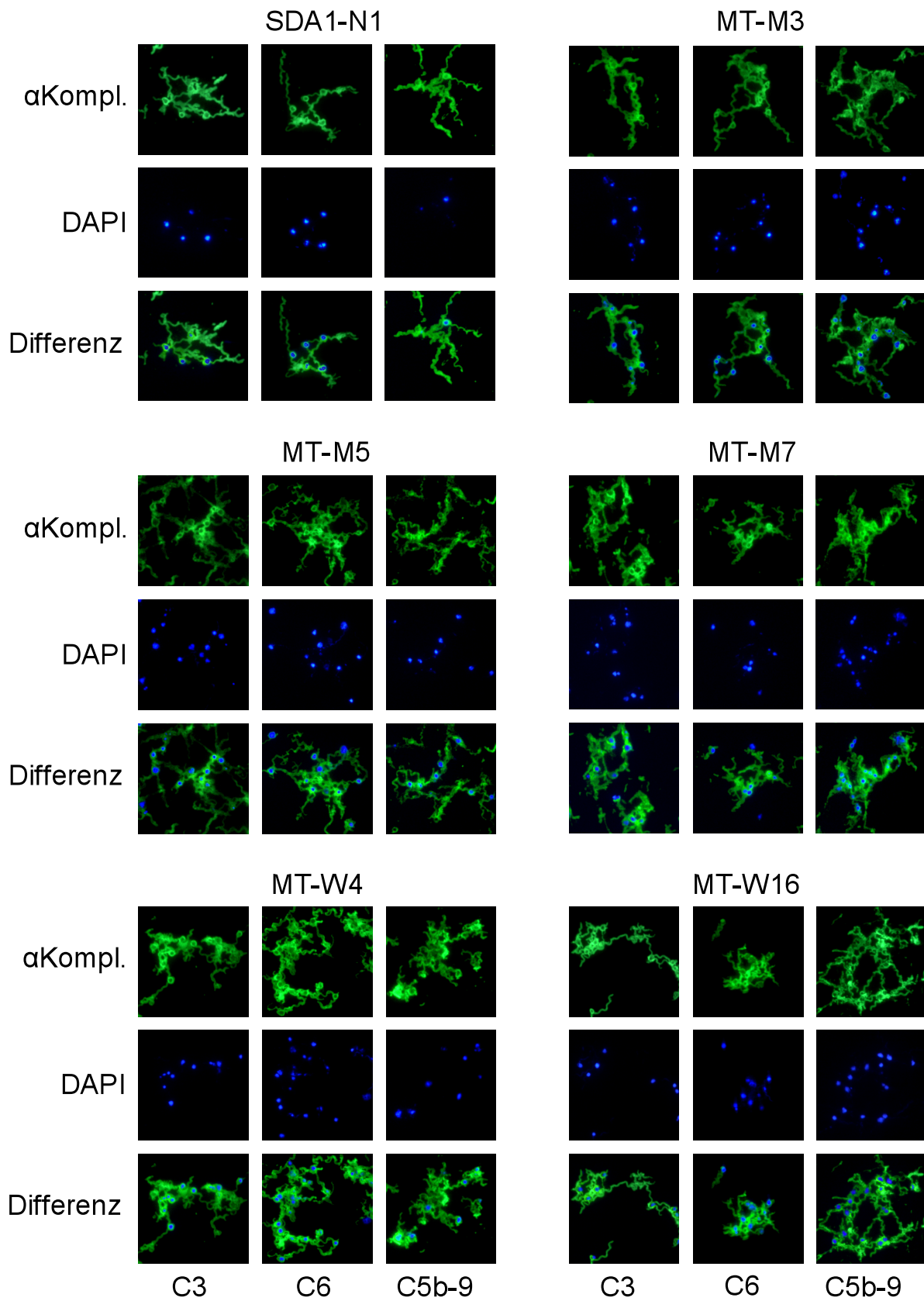
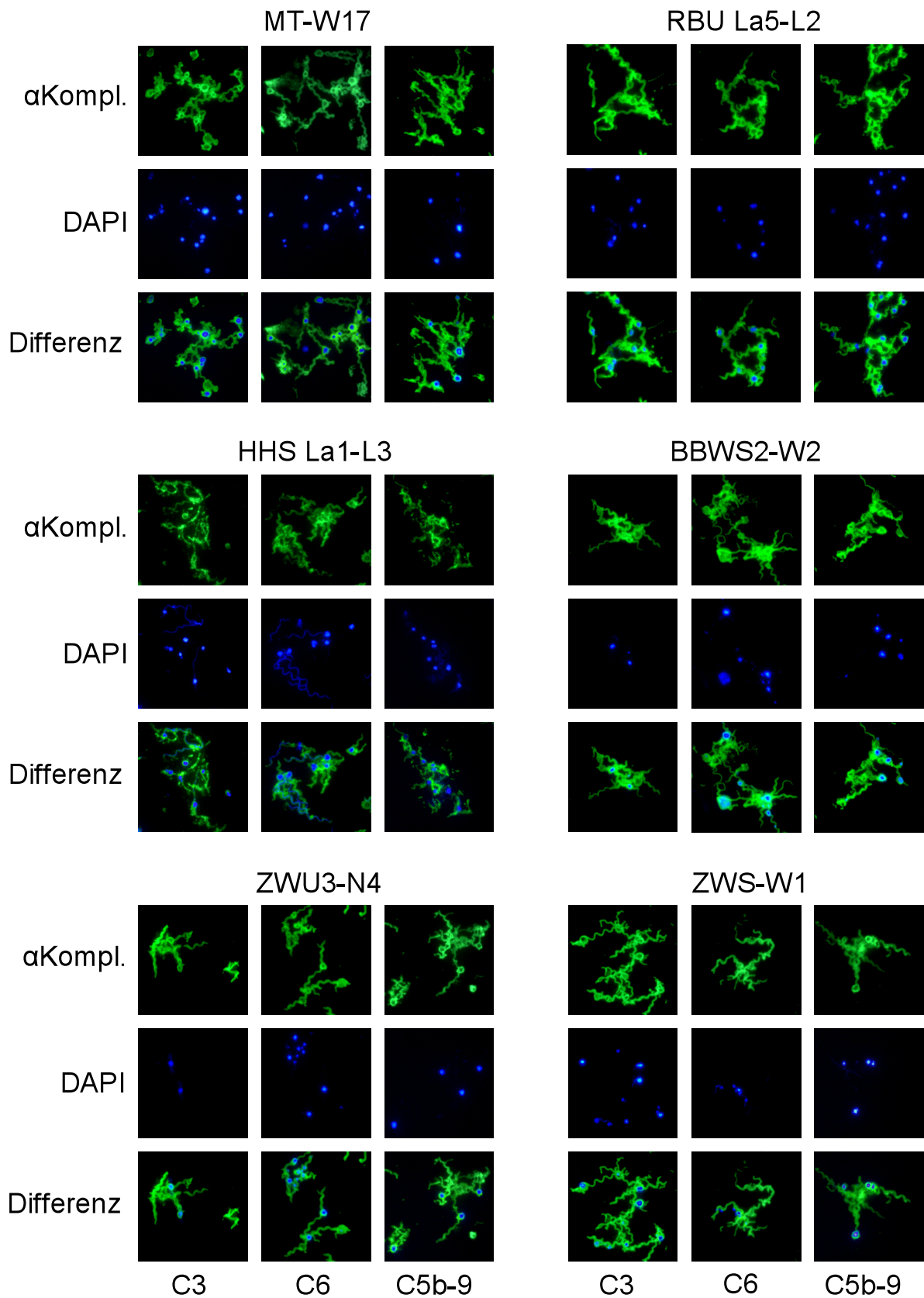


Abb. A1, Nachweis der Serumempfindlichkeit von *B. lusitaniae*. Der Serumbakterizidietest wurde mit den *B. lusitaniae*-Isolaten SDA-N1, MT-M3, MT-M5, MT-M7, MT-W4, MT-W16, MT-W17, RBU La5-L3, HHS La-L3, BBWS2-W2, ZWU3-N4 und ZWS-W1 durchgeführt. $1,25 \times 10^7$ Borrelienzellen wurden in 50 % NHS (▲) bzw. 50 % hiNHS (■) über 10 Tage bei 33°C inkubiert und die Extinktionswerte alle 24 h photometrisch gemessen. Die Tests erfolgten in 3facher Ausführung an unterschiedlichen Tagen. Die dargestellten Wachstumsverläufe repräsentieren jeweils ein Experiment bestehend aus 3 Parallelansätzen, deren Extinktionswerte gemittelt und mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt wurden.





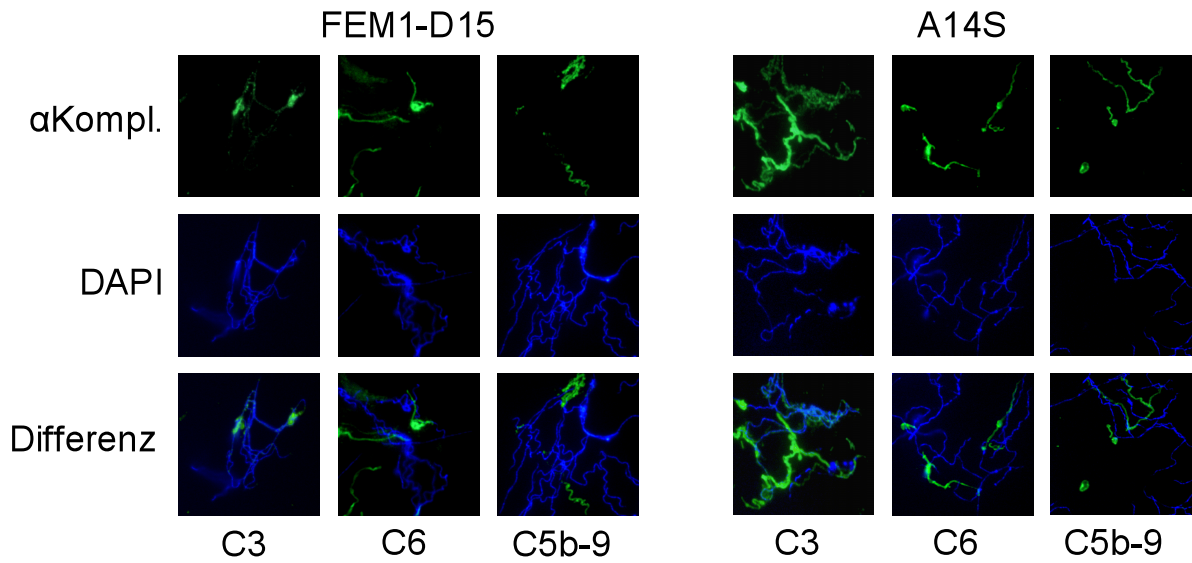


Abb. A2, Nachweis der Ablagerung aktivierter Komplementkomponenten auf Borrelienzellen. 6×10^6 Borrelienzellen wurden in 25 % NHS für 30 min bei 37°C inkubiert und die Komplementkomponenten C3, C6 und C5b-9 mittels IFT nachgewiesen. Für die Detektion dienten polyklonale Antikörper gegen die Komplementkomponenten C3 bzw. C6 und ein monoklonaler spezifischer Antikörper gegen den humanen terminalen Membranangriffskomplex (C5b-9). Die Gegenfärbung der bakteriellen DNA erfolgte mit DAPI. Gezeigt sind die *B. lusitaniae*-Isolate SDA-N1, MT-M3, MT-M5, MT-M7, MT-W4, MT-W16, MT-W17, RBU La5-L3, HHS La-L3, BBWS2-W2, ZWU3-N4 und ZWS-W1 sowie das serumresistente *B. afzelii*-Isolat FEM1-D15 und das serumresistente *B. spielmanii*-Isolat A14S.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „Vergleichende Untersuchungen zur Serumempfindlichkeit von *Borrelia lusitaniae*“ im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. phil. nat. Peter Kraiczy ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 01.01.2010